農業試驗所

120 週年所慶系列學術活動

生物性肥料開發應用及土壤微生物生態研究之回顧與展望研討會

林素禎、吳宗哲、張明暉、簡宣裕、郭鴻裕　　彙編

主辦單位：行政院農業委員會農業試驗所
協辦單位：行政院農業委員會臺中區農業改良場
行政院農業委員會臺南區農業改良場
行政院農業委員會高雄區農業改良場
行政院農業委員會臺東區農業改良場
行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
行政院農業委員會農糧署
國立中興大學土壤環境科學系

行政院農業委員會農業試驗所　編印

中華民國 104 年 10 月

生物性肥料開發應用及土壤微生物生態研究之回顧與展望研討會議程

主辦單位：行政院農業委員會農業試驗所

時 間：104 年 10 月 30 日 (星期五)

地 點：行政院農業委員會農業試驗所 農民學院大樓三樓 國際會議廳（台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號）

時　間	題　　目	主持人/主講人
9:00～9:20	報到、領取會議資料	
9:20～9:30	開幕式、長官致詞	所長
	第一節主持人	簡宣裕 研究員 農業試驗所
9:30～10:00	微生物肥料商品化保存及其複合介質應用在苗木之開發	楊秋忠 教授 國立中興大學
10:00～10:30	利用有益微生物及袋式堆積法製作稻殼雞糞堆肥之研究	蔡宜峰研究員 臺中區農業改良場
10:30～10:50	休息與茶敘	
10:50～11:20	臺東地區重要作物溶磷菌之開發研究	黃文益 助理研究員 台東區農業改良場
11:20～11:50	羽毛分解菌應用於微生物肥料之開發研究	曾宥綋 助理研究員 臺中區農業改良場

11:50～12:20	羽毛分解菌之篩檢技術	羅致逑 研究員 農業藥物毒物試驗所
12:20～13:20	午餐及休息	
	第二節主持人	楊秋忠 教授 國立中興大學
13:20～13:50	蔬菜與加工產品中食媒性病原菌調查	羅致逑 研究員 農業藥物毒物試驗所
13:50～14:20	菌根菌應用技術對高屏地區芒果生育之研究	張耀聰 助理研究員 高雄區農業改良場
14:20～14:50	菌根菌應用技術-台南地區文旦柚應用研究	黃瑞彰 副研究員 臺南區農業改良場
14:50～15:10	休息與茶敘	
15:10～15:40	鳳梨皮經 *Azotobacter beijerinckii* A13 醱酵產出生物肥料及評估對小白菜生長效益之研究	簡宣裕 研究員 農業試驗所
15:40～16:10	叢枝菌根菌在作物生長效益之回顧	林素禎 助理研究員 農業試驗所
16:10～17:10	綜合討論	
17:10～	賦歸	

目錄

微生物肥料商品化保存及其複合介質應用在苗木之開發 5

利用有益微生物及袋式堆積法製作稻殼雞糞堆肥之研究 15

臺東地區重要作物溶磷菌之開發研究 24

羽毛分解菌應用於微生物肥料之開發研究 32

羽毛分解菌之篩檢技術 40

蔬菜與加工產品中食媒性病原菌調查 49

菌根菌應用技術對高屏地區芒果生育之研究 59

菌根菌應用技術—台南地區文旦柚應用研究 75

鳳梨皮經 *Azotobacter beijerinckii* A13 醱酵產出生物肥料及評估對小白菜生長效益之研究 . 87

叢枝菌根菌在作物生長效益之回顧 100

微生物肥料商品化保存及其複合介質應用在苗木之開發

洪美華 [1] 賴威安 [2] 譚鎮中 [1] 陳鴻基 [1] 楊秋忠 [3]

摘要

本研究自本實驗室自行分離及鑑定的產孢微生物*Bacillus* sp. （6 菌株）、*Streptomyces* （1菌株）、*Micrococcus* sp.（1菌株）、*Meyeronzyma* (1菌株) 、*Pichia* sp.（3菌株）以及*Rhodotorula* (1菌株)，以及非產孢微生物*Azospirilum* sp （2菌株）、*Rhizobium* sp.（2菌株）、*Bradyrhizobium* sp. （1菌株）、 *Sinorhizobium* sp. （1菌株）；*Lactobacillus* sp. （3菌株）；*Pseudomonas* sp. （1菌株）。產孢微生物各菌株與BN擔體混合、非產孢微生物各菌株與M+A+B擔體混合分別製成的微生物菌劑，利用數種栽培介質進行美濃瓜（*Cucumis melo* L.）穴盤苗植物生長試驗，結果顯示未接種的植株地上部乾重以Tref及Tref+蛭石介質較佳；施用複合菌株的處理，產孢菌以CC-YHH053、CC-YHH069、CC-88176的菌劑的促進效果最佳，分別可提高地上部生質量153%、161%和154%(Tref介質中)。非產孢微生物CC-RB301、CC-NO19-1、CC-NO20-1均可顯著提高植株地上部乾重（分別為53.9%、55.3%和41.1％）(在KING介質中)。選擇較具促進作物生長效果之菌株進行微生物商品化最低標準進試驗的評估。結果顯示產孢微生物CC-YHH069、CC-YHH053菌株以M1-1修正配方具較佳保存效果，而非產孢微生物CC-RB300則以M+A+B擔體具較佳保存能力，CC-NO20-1則以B擔體的活菌保存能力較佳。其菌數均可於6個月內維持在Log CFU 7(含)以上。本研究成果可提高微生物肥料製劑商品化的應用價值。

關鍵詞：生物肥料、植物生長促進細菌(PGPB)、產孢微生物、介質、擔體複合接種劑

1.國立中興大學土壤環境科學系

2.國立中興大學生物科技發展中心

3.國立中興大學土壤環境科學系國家講座教授，e-mail: ccyoung@mail.nchu.edu.tw

前言

「生物肥料」(biofertilizer)或稱為「微生物肥料」，根據中華民國政府於2013年4月3日制定的「肥料管理法」的「肥料種類品目及規格」中，對於「生物肥料」的定義為:「指其成分含具有活性微生物或休眠孢子，如細菌、放線菌、真菌、藻類及其代謝產物之特定製劑，應用於作物生產具有提供植物養分或促進養分利用等功效之物品。」(行政院農委會農糧署，2013)；而楊秋忠（2014）的定義為：「係指人工培養之土壤微生物，利用活體微生物在土壤中以提供作物營養分、增進土壤營養狀況或改良土壤之物理、化學和生物性質，藉以增加作物產量及品質者。」 微生物肥料的種類商品主要是液劑及固劑二大類，液體微生物肥料的保存性差，易受污染及膨罐問題，但液態商品成本較低。固態微生物肥料主要是由液態生產後乾燥或固體醱酵而成，成本較高，但易運送保存。無論格蘭氏陰性或陽性的植物生長促進細菌（PGPB）的接種方法，需要將接種劑運送至土壤中並使菌體與土壤橫切面得以混合的「擔體」（carrier）(Martínez-Viveros *et al.*, 2010；Lin *et al.*, 2015)。本研究期以探討開發有效且保存能力高之商品化微生物肥料之產品以及技術。

材料與方法

（一） 產孢及不產孢微生物肥料之菌種的分離及鑑定

所有微生物均來自於本實驗室自天然環境所分離以及鑑定之菌株，其菌屬鑑定的方式主要是利用萃取之 DNA，利用聚合酶鏈反應擴增 16S rRNA 基因，依照 Willems and Collins (1993) 所述方法進行鑑定（Young *et al.*, 2005）。將 16S rRNA 基因核苷酸序列與美國生物資訊中心（NCBI）基因資料庫（GenBank）中的標準菌株(type strain)進行比對 (Altschul *et al.*, 1997)，其所得的結果即為菌屬鑑定之依據。本研究挑選的產孢微生物種類包括：細菌 *Bacillus* sp. CC-MHH0006、CC-Jabot01、CC-MHCA、CC-MALig3、CC-YHH069 和 CC-YHH053 菌株；放線菌 *Streptomyces* sp. CC-F2-B、*Micrococcus* sp. CC-CFT082 以及酵母菌 *Merozyma* sp. CC-94009、*Pichia* sp. CC-88176、CC-94006、*Rhodotorula* sp. 88218 等 13 株；非產孢菌株包

括： *Azospirilum* sp CC-CFT025、CC-RW20-51；*Rhizobium* sp. CC-RB 300、CC-RB301、CC-PN287、*Bradyrhizobium* sp. CC-PN300、 *Sinorhizobium* sp. CC-SB1126；*Lactobacillus* sp. CC-NO19-1、CC-NO20-1 與 CC-CY924；*Pseudomonas* sp. CC-YMM-1 等 11 株。

(二) 微生物複合擔體的製作：

將微生物菌液與有機質擔體(1:1體積)複合成菌劑，產孢微生物使用與經120℃2天烘乾的碎植物材料(簡稱BN)當作擔體。非產孢微生物所使用之擔體有：稻殼 (CRH)和稻殼(重量比1：1)(簡稱FRH+RB)、穀粕(B)、礦粉M+礦粉A+穀粕（重量比1：1：1）(簡稱M+A+B)、礦粉（V）、礦粉（M）、粕（RB）、礦粉（M）+粕（RB）（重量比1：1）(簡稱M+RB)(Hung *et al*., 2014)。

(三) 苗木生長評估：

將微生物擔體菌劑以盛裝介質的穴盤進行接種美濃瓜（musk melon，學名為*Cucumis melo* L.）生長試驗。產孢微生物接種選用的栽培介質有Tref(荷藍進口)、滿地王（KING，德國進口）及BVB#3: 蛭石:珍珠石(2:1:1)(簡稱BVP) ；非產孢微生物接種，則選用BVB＃３、滿地王（KING）與Tref+蛭石(T+V)。將種子催芽後，播於裝有介質的20孔穴盤(33×28.1公分，孔5.9直徑×5.1高度公分)中，每穴一粒。以複合菌劑為處理組，以不接菌劑為控制組。每一種處理四重複，於網室設施栽培。試驗期間分別為2013年9月-10月（產孢微生物接種）及2014年5月份（非產孢微生物接種），其平均氣溫分別為30.8℃及25.8℃，平均相對濕度69%及78%，月平均日照為205.6小時及75.8小時。播種後一個月後採收，將植株地上部於70℃的烘箱乾燥至恆重，精稱其乾重(Huang *et al*., 2013)。

(四) 開發微生物肥料菌株的優化培養：

將促進美濃瓜效果較顯著的微生物肥料進行優化培養試驗。產孢微生物*Bacillus* sp. CC-YHH059、CC-YHH053菌株於不同NB (Himedia)、TSB(BD)+Mn，30℃ 5-7天，55℃與4℃各24小時。修改的配方medium 1-1 +1 % KCl(pH8)，培養5天。修改Medium 1-1 (pH 4.7、pH

8.5、+NaCl) 進行生長及產孢條件的測試。將非產孢微生物所使用之擔體有：稻殼 (CRH)和米糠(重量比1：1)(簡稱FRH+RB)、穀粕(B)、兩種礦粉+穀粕（重量比1：1：1）(簡稱M+A+B)、礦粉V、礦粉M、粕RB、礦粉M+粕RB（重量比1：1）(簡稱M+RB)。分別將複合微生物肥料裝入容量為140 ml 的高密度聚乙烯（HDPE）樣品瓶內，於室溫下經過0-6個月的貯存時間，測定菌劑之菌數量。營養菌體的活菌數，則以標準塗抹方法測定樣品中的活菌數。孢子數量的測定方法為取適量樣品經過80℃加熱10 分鐘後，或以55℃ 加熱3小時後再於4℃存放24小時，然後以平板塗抹法計算菌落數(CFU)。

(五) 統計與分析

以SPSS version 13.0 軟體套組 (SPSS Inc., Chicago, USA)，以one-way analysis of variance (ANOVA) 利用Duncan's multiple range test 進行統計分析。

結果與討論

本研究將13種產孢微生物與BN擔體；11種非產孢細菌與M+A+B擔體，分別製成複合菌劑，以美濃瓜苗配合栽培介質(分析資料見表1)進行植物生長試驗，結果顯示未接種的植株地上部乾重以介質T及T+V較佳；施用複合菌株接種劑的處理，產孢菌以CC-YHH053、CC-YHH069、CC-88176的菌劑的促進效果最佳，可提高地上部生質量153%、161%和154%(Tref介質中)。非產孢微生物CC-RB301、CC-NO19-1、CC-NO20-1均可顯著提高植株地上部乾重（分別為53.9%、55.3%和41.1％）(在KING介質中)（見圖1）。

將促進美濃瓜穴盤苗生長功能較佳之微生物(見圖1)依照農委會最新修正公佈的《各類肥料品目及規格》規定，固態微生物肥料的有效活菌數標準為10^7 CFU g^{-1}以上，液態微生物肥料的標準為10^8 CFU g^{-1}以上；有效期限為6個月以上（行政院農委會農糧署，2013）。因此以此為最低標準進行下列試驗的評估。結果顯示產孢微生物CC-YHH069、CC-YHH053以M1-1修正配方具較佳保存效果(圖2.A、B)，而非產孢微生物CC-RB300則以M+A+B擔體具較佳保存能

力，CC-NO20-1則以B擔體的活菌保存能力較佳(見如圖2.C、D)。其菌數均可於6個月內達成Log CFU 7(含)以上。

結論

本研究開發產孢微生物肥料及其較佳之培養基配方(代號M1-1)以及非產孢微生物之較佳複合擔體(代號M+A+B）製成的接種菌劑可有效促進美濃瓜作物穴盤苗的生長。

誌謝

本研究承農業發展委員會計劃、國科會及教育部經費補助。謹致謝意。

表1.三種栽培介質性質及組成的分析結果

Table 1. Characteristics of three used plant growing media

Items:	KING	Tref	BVB#3
Moisture%(w/w, wet basis)	59	68	64
Organic matter %(w/w, dry basis)	91	90	91
NH_4^+-N(mg kg^{-1})	2.8	2.08	44.58
NO_3^--N(mg kg^{-1})	497.9[1]	402.99	5.439
P(mg kg^{-1})	151.4	45.74	113.92
Na(mg kg^{-1})	81.5	59.22	63.34
K(mg kg^{-1})	696.3	257.96	500.20
Ca(mg kg^{-1})	4752.4	4303.59	3616.86
Mg(mg kg^{-1})	340.0	534.14	771.31
Mn(mg kg^{-1})	8.5	4.69	0.82
Fe(mg kg^{-1})	88.2	42.38	41.32
Mn(mg kg^{-1})	22.3	10.91	7.63
Cu(mg kg^{-1})	1.5	0.57	0.49
Zn(mg kg^{-1})	8.3	2.94	3.98
Cd(mg kg^{-1})	0.07	0.03	0.04
Cr(mg kg^{-1})	0.04	0.01	0.01
Ni(mg kg^{-1})	0.11	0.01	0.03
Pb(mg kg^{-1})	1.20	0.41	0.99

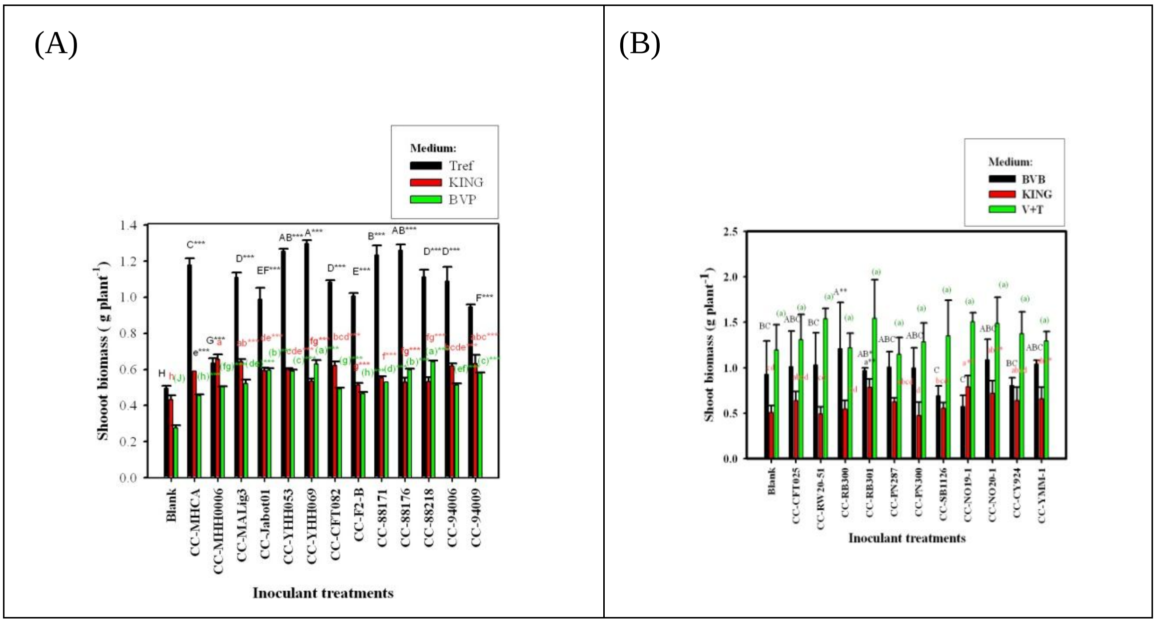
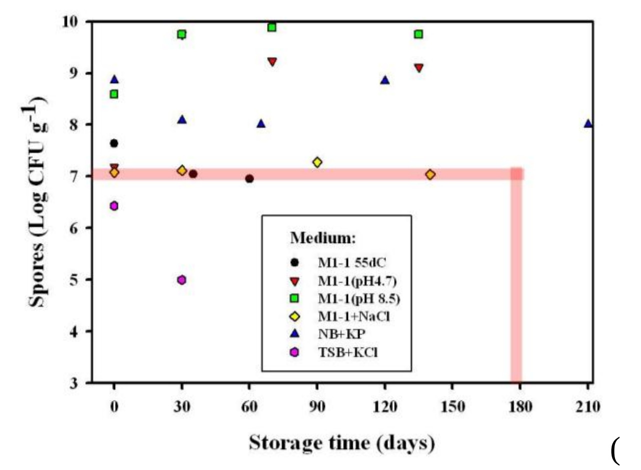
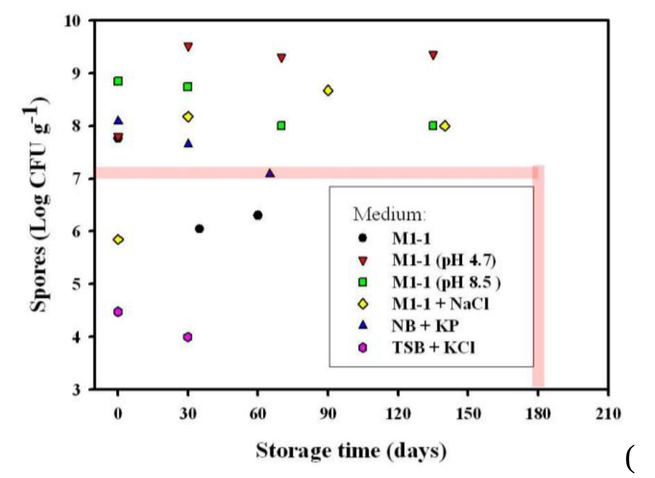


圖1.施用(A)產孢(B)不產孢菌種複合擔體菌劑於三種不同介質中美濃瓜植株重量

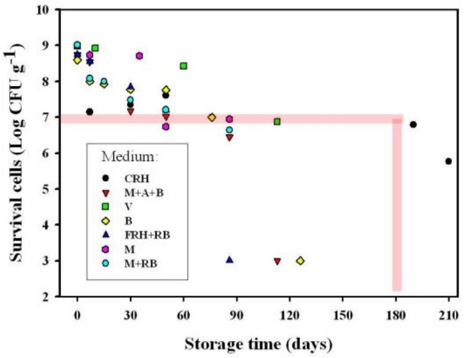
Fig. 1. Shoot dry weights of musk melon with carrier based inocula consisted of spore - (A), or non-spore forming (B) strains in three different plant growth media



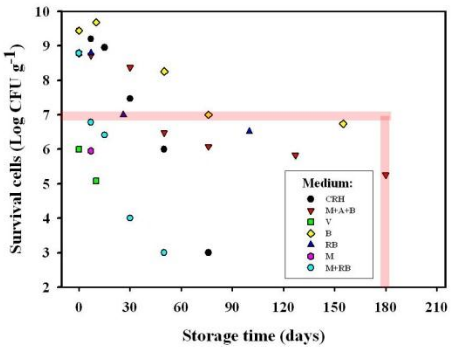
A) CC-YHH069



B) CC-YHH053



(C) CC-RB300



(D) CC-NO20-1

圖2.產孢(A、B)及非產孢菌(C、D)在不同培養基中的菌劑中經不同天數的存活菌數

Fig. 2. Storability of spore (A and B) and non-spore forming strains (C and D) in various carriers

參考文獻

1. 行政院農委會農糧署。 2013 。肥料種類品目及規格(農糧字第 1021052625 號)。

2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaeffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

3. Corry, J. E. L., G. D. W. Curtis, and R. M. Baird. 1995. Culture Media for Food Microbiology, Vol. 34, Progress in Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam.

4. Huang, J.-C., W.-A. Lai, S. Singh, A. Hameed, and C.-C. Young. 2013. Response of mycorrhizal hybrid tomato cultivars under saline stress. J. Soil Sci. Plant Nutr. 13 (2): 469-484.

5. Hung M.-H., W.-A. Lai, C.-C. Tan, H.-J. Cheng, Z.-C. Luo, and C.-C. Young. 2014. Development of biofertilizer with commercially available storability and application of carrier based inocula and solid media for cultivation of seedlings. P. 143-157. In: Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Excutive Yuan (ed.) 2014 Proceeding of workshop on research achievement by Soil Microorganism and Ecology Task Force, agriculture and

environment sector. Held on November 27, 2014, Wufeng District, Taichung (in Chinese)

6. Hung, M.-H., A. B. Arun, F.-T. Shen, P. D. Rekha, and C.-C. Young. 2005. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. Pedobiologia 49: 577-584.
7. Lin, H.-Y., W.-A. Lai, M.-H. Hung and Chiu-Chung Young. 2015. Effect of different carriers and formulations on survival rate of rhizobia. No. A018, p.65. In Agricultural Chemical Society of Taiwan (ed.) Proceeding of 53th Conference on Agriculture Chemistry. (in Chinese)
8. Martínez-Viveros, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo, and M. L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Plant Nutr. Soil Sci. 10 (3): 293 – 319.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (eds.). 1995. Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Vincent, J.M., 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell Scientific, Oxford.
11. Willems A., and M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 43 : 305-313.
12. Young, Chiu-Chung (楊秋忠). 2014. Soil and Fertilizer: Concepts and Practices. Taichung: National Chung Hsing University. P. 386-387.
13. Young, C. C., P. Kämpfer, F. T. Shen, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2005. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 423-426.

Abstract

The spore forming microorganisms *Bacillus* （n=6）, *Streptomyces* （n=1）, *Micrococcus*（n=1）, *Meyeronzyma* (n=1), *Pichia* （n=3）and *Rhodotorula* (n=1) ; and non-spore forming bacteria root nodulating bacteria (n=5), *Azospirillum* (n=2), *Pseudomonas* (n=1) and *Lactobacillus* (n=3), isolated from various sources, were tested for the development of carrier-based inocula for the cultivation of plug seedling of musk melon (*Cucumis melo* L.). The carriers BN and M+A+B were used as carriers for preparation of the inocula with spore forming and non-spore forming strains, respectively. The results evidenced that crop without inoculation showed dry shoot biomass was obtained in Tref and Tref+vermiculite; and CC-YHH053, CC-YHH069 and CC-88176 among spore forming strains significantly improved the shoot biomass by 153, 161 and 154%, respectively (in Tref medium). And CC-RB301、CC-NO19-1、CC-NO20-1among non-spore forming strains also improved the shoot biomass by 53.9, 55.3 and 41.1%, respectively(in KING medium). The potential plant growth promoting strains were selected to develop biofertilizer products with commercially available storability in line with regulations and standards. During 6-month storage, the 10^7 CFU g^{-1} cells were achieved by growing and sporulation of spore forming strains CC-YHH069 and CC-YHH053 in modified medium M1-1 and mixed with carrier BN; and also by mixing the cells of non-spore forming strains CC-RB300 and CC-NO20-1 with carriers M+A+B and B, respectively. This results may improve the application of innovative biofertilizer in agriculture.

Key words：Biofertilizer, Plant Growth Promoting Bacteria(PGPB), Spore forming microorganisms, Media, Carrier-based inocula.

利用有益微生物及袋式堆積法製作稻殼雞糞堆肥之研究

蔡宜峰[1,2] 陳俊位[3]

摘要

本研究探討利用有益微生物及袋式堆積法製作稻殼雞糞堆肥之相關技術，以作為日後相關農業副產物再生資源化的支援技術。試驗包括(A)不加菌、無覆蓋；(B)不加菌、覆蓋不織布；(C)接種木黴菌(*Trichoderma* sp.)分離菌株(TCT111) 及芽孢桿菌(*Bacillus* sp.)分離菌株(TCB10007)、無覆蓋；(D)接種木黴菌(*Trichoderma* sp.)分離菌株(TCT111)及枯草桿菌(*Bacillus* sp.)分離菌株(TCB10007) 、覆蓋不織布等四種處理，堆肥材料為稻殼雞糞，每一試驗處理約1,150 kg。由試驗結果顯示，有接種 TCT111 及 TCB10007 等處理 C 及 D 的堆肥溫度可以在堆積第 2 日達到 60℃，且在堆積第 2~12 日期間堆肥溫度均可維持 60℃以上，處理 A 及 B 的堆肥溫度則在堆積第 5~10 日期間堆肥溫度維持在 60℃以上，在堆積第 21 日各處理堆肥溫度均降低至 50℃以下。堆積第 30 日稻殼雞糞堆肥之 pH 值、EC 值、有機質、氮、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅等含量在不同處理間差異不顯著，其中 EC 值、有機質及氮含量較堆積前呈現減少，pH 值、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅等含量則呈現增加。此時 A、B、C、D 各處理堆肥的碳氮比分別為 16.0、15.8、14.5 及 15.1。經利用堆肥水萃取液(堆肥與水體積比 1：10)進行分析，各試驗處理之萵苣及小白菜種子發芽率分別約為 83.3~95.0%及 81.7~100%。顯然經堆積第 30 日，上述處理之稻殼雞糞堆肥的分解醱酵已達到穩定階段。

關鍵詞：稻殼雞糞、木黴菌、枯草桿菌、堆肥化。

前言

所謂堆肥化作用即利用廣泛分佈於自然界之微生物，在控制的條件下，將廢棄物中不穩定的有機組成分加以分解，轉換為安定的腐植質成分，即腐熟的堆肥[12, 14]。有機材料在適當的條件下堆積醱酵，可以縮短有機物分解的時間，而生產出物理性狀均一，化學成分穩定的高品質堆肥[5, 9]。堆肥化前有機物基質中應含有適當的營養要素成分，並需將堆肥化前有機物基質中各種營養要素成分調整至較適宜比例範圍內，以利於微生物進行堆肥化作用[13, 15]。不同的堆積材料如能接種適當的微生物菌種，將可以加速堆肥分解醱酵[6, 7]。其次在堆肥化過程

1. 通訊作者。
2. 行政院農委會臺中區農業改良場埔里分場研究員兼分場長。
3. 行政院農委會臺中區農業改良場副研究員。

的堆積材料環境中，維持微生物最適宜之生長條件，使微生物充分的活動與繁殖，將能夠加強堆肥材料的醱酵腐熟[20]。施用未經腐熟的有機物，容易造成土壤過度還原性及釋出毒性物質等問題。如能經過適當的堆肥化處理，製成高品質有機質肥料，如此不僅可以提升農田地力，且減少有機廢棄物對環境之衝擊[3, 5, 11]。微生物在堆肥化過程中，擔任有機物分解與堆肥穩定化之重要角色[20]。人工接種腐熟菌群(含芽孢桿菌、放線菌、酵母菌等)增加了牛糞堆肥中微生物總體數量，豐富了微生物種群多樣性，促進了堆肥菌群演替，堆肥腐熟時間縮短，同時能夠減少堆肥過程中氮素損失[4]。雞糞堆肥經過接種微生物菌劑，可以明顯提高堆肥初期的醱酵溫度，加快堆肥物料的水分揮發，改變雞糞中的微生物數量，縮短堆肥醱酵週期，促進堆肥快速腐熟[2]。有鑑於目前臺灣地區多數農友仍然習慣性施用未經腐熟的禽畜糞等，易造成農田土壤特性與環境不良等困擾。因此，有必要研發建立一套成本低廉、操作方法簡易且快速的堆積腐熟技術，讓農友能夠輕易在農田周邊製作禽畜糞堆肥，並廣為接受與應用。本研究擬探討利用有益微生物及袋式堆積法加速禽畜糞堆肥腐熟之效益，研發建立簡易之標準製程方法，以供相關堆肥業者及農友應用之參考。

試驗材料與方法

試驗項目與方法

本試驗於臺中區農業改良場埔里分場之露天式堆肥場進行，堆肥試驗之主要材料為稻殼雞糞(約 30~35 kg/包)，包裝袋為一般肥料及飼料慣用編織袋，並利用本場微生物實驗室由中部地區有機農場土壤及自製堆肥中篩選及純化獲得之有益微生物，包括木黴菌分離菌株 TCT111 (*Trichoderma* sp.)及芽孢桿菌分離菌株 TCB10007(*Bacillus* sp.)等，組合成四級處理(表 1)。其中處理 A 不加菌、無覆蓋，於稻殼雞糞加水至約 50%水分含量(重量比)；處理 B 不加菌、覆蓋不織布(黑色聚酯纖維、厚度 1.0mm），於稻殼雞糞加水至約 50%水分含量(重量比)；處理 C 為稻殼雞糞加有益菌懸液及水至約 50%水分含量(重量比)、無覆蓋；處理 D 為稻殼雞糞加有益菌懸液及水至約 50%水分含量(重量比)、覆蓋不織布。上述每一處理堆疊成 6 包×6 層=36 包稻殼雞糞(約 1,150 kg)，堆積體約長 265 cm×寬 95 cm×高 150 cm，試驗期間適逢下雨時另於堆積體上方表層加覆蓋防雨塑膠布。處理 C 及 D 先取適量有益微生物菌種(10^9 cfu/g)，加水稀釋 200 倍成有益菌懸液，再於每包材料中添加入 10 公升有益菌懸液，再加水調整每包材料水分含量至 50%。處理 A 及 B 於每包材料中灌注與處理 C 及 D 等量水並調整水分含量至 50%，隨後立即進行堆積製作。試驗期間堆肥溫度測量及採樣位置，以堆積體長方形分成東南西北四方位，每一方位再分成高、中、低三點，計 12 點，分別以不鏽鋼製溫度計量測溫度(12 重覆)，以及利用不鏽鋼採土器採取堆肥樣品，採樣及測量點於堆肥表面深入約 20~50 cm 之間。在堆肥製作期間，除了定期測量溫度，並分別於製作堆積前及堆積第 30 日採取堆肥材料樣品(東南西北方位 4 重覆)，進行 pH 值、EC 值、有機質、氮、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅等主要化學特性分析。另以堆肥：水為 1 : 10 (體積比)攪拌混合後，於室溫下浸置

24小時，取上澄液進行萵苣(*Lactuca sativa* L.)及小白菜(*Brassica chinensis* L.)種子發芽率分析[1]。

化學分析項目及方法

有機材料與堆肥樣品採樣後，經70℃烘乾及磨粉，再以濕灰法(硫酸)分解後測定氮、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅含量，其中以微量擴散法測定全氮量[10]，利用鉬黃法呈色及分光光度計(於420 nm下)比色法測定全磷量[19]，利用燄光分析儀測定全鉀量[16]，利用原子吸收分析儀測定鈣、鎂、鋅及銅含量[17]。有機質含量採用Walkley-Black法測定[18]，pH、EC值以水：有機材料(堆肥)＝10:1(v/v)萃取後，利用酸鹼度計及導電度計測定。

結果與討論

溫度是反應堆積材料中某一層次之微生物活動情形，當堆肥化過程進行正常時，初期溫度逐漸升高達60℃以上，然後逐漸下降至周圍溫度[20]。溫度之升與降，反映出不同有機物之分解階段，爾後隨堆肥逐漸腐熟，溫度呈現下降乃至恒溫[7, 14]。由堆積試驗期間堆肥溫度調查結果顯示(圖1)，有接種TCT111及TCB10007等處理C及D的堆肥最高溫度可以在堆積第2日達到60℃，且在堆積第2-12日期間，堆肥溫度均可維持60℃以上，在堆積第21日堆肥溫度可以降低至50℃以下。處理A及B的堆肥最高溫度則在堆積第5日達到60℃，在堆積第5~10日期間堆肥溫度維持在60℃以上。在堆積第21日各處理堆肥溫度可以降低至50℃以下，而趨近於穩定階段。

綜合圖1結果顯示，未接菌之A及B處理的堆肥最高溫度在堆積第5日以上才能達到60℃以上，而相對於使用相同材料配方且有接種分離菌株TCT111及TCB10007等複合菌株之C及D處理的堆肥最高溫度在堆積第2日內已達到60℃以上。且由本試驗製作堆積第1~20日期間，接種複合菌株之C及D處理堆肥最高溫度高於未接菌之A及B處理。顯然接種分離菌株TCT111及TCB10007等複合菌株處理對稻殼雞糞堆肥製作堆積初期具有快速增溫，且最高溫維持在60℃以上期間較長，有利於稻殼雞糞的分解醱酵。而有無覆蓋不織布處理間，包括處理A及B；或處理C及D，相對比較則無明顯的差異。由於本研究目的是開發建立一套成本低廉、操作方法簡易且快速的堆積方法，以期取代目前多數農友仍慣用生鮮未發酵禽畜糞的習性，由上述結果初步顯示，利用袋式堆積法及接種分離菌株TCT111及TCB10007處理，在堆積第2~12日期間，堆肥最高溫度可維持60℃以上，顯然已經達到促進稻殼雞糞分解醱酵的目標。

堆肥製作堆積過程中，主要是利用微生物將有機材料加以分解醱酵，當微生物進行分解作用時，需要碳當作生活能源，同時也需氮維持生命及建造體細胞[12, 20]。基本上，堆肥腐熟度尚無法由單一指標予以判斷，經由檢測堆肥化過程中堆肥材料碳氮比(C/N)的變化與穩定趨勢，可視為判斷堆肥腐熟指標之一[7, 14]。由本研究稻殼雞糞堆肥在製作堆積過程中堆肥材料C/N之變化結果顯示(圖2)，有接種分離菌株TCT111及TCB10007等複合菌株處理C及D的堆肥材料C/N在製作堆積第30日內分別為14.5及15.1，未接菌處理A及B的堆肥材料

C/N 在製作堆積第 30 日分別約為 16.0 及 15.8，顯然有接種分離菌株 TCT111 及 TCB10007 等處理的堆肥 C/N 較低於未接菌處理者，顯示有接菌的 C 及 D 處理具有較快的分解效率，使堆肥 C/N 可以較快降低而趨近於穩定階段。另無論有無接菌處理，比較有無覆蓋不織布處理(A 及 B 或 C 及 D)間堆肥材料 C/N 則無一致效應且差異不大，顯然有無覆蓋不織布處理對堆肥材料 C/N 幾無影響。本研究稻殼雞糞 C/N 由堆積試驗前 16.8 逐漸降至堆積第 30 日之 14.5~16.0，且處理堆肥 C/N 之變化已有趨緩情形，顯示本研究各處理稻殼雞糞堆肥的分解醱酵在堆積第 20~30 日已漸趨近穩定階段。研究指出當堆肥材料在堆積過程經由微生物進行醱酵分解時，有機材料中之碳氮比會逐漸降低至穩定，此時堆肥也接近腐熟階段[12]。

當堆肥材料在堆積分解過程進行時，有機材料的碳水化合物、纖維素及部份木質素等有機組成分，會被微生物逐漸分解生成二氧化碳及水，致使堆肥材料的有機碳量及乾物量減少[12, 15]，另外堆肥體部分區域會呈現還原態及 pH 值升高，前者易使硝酸態氮還原產生脫氮作用，後者易造成銨態氮轉化成氨氣而揮失[14]。亦有研究指出，碳氮比較高的有機材料，可在堆肥製作前添加適量的尿素或磷酸等化學肥料資材，在堆肥化過程中，亦會經由微生物作用且轉化成有機型態，而增加腐熟堆肥的肥料成分含量[8]。由本研究製作堆積第 0 及 30 日稻殼雞糞堆肥之主要化學特性分析結果顯示(表 2)，在堆積第 30 日 4 種處理稻殼雞糞堆肥 pH 值、EC 值、有機質、氮、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅等成分含量在不同處理間差異不顯著。由表 2 亦顯示，稻殼雞糞之主要化學特性經過堆積 30 日後，其中 EC 值、有機質及氮含量呈現減少，pH 值、磷、鉀、鈣、鎂、銅及鋅等含量呈現增加。一般堆肥化過程中，堆肥材料中碳及氮將因分解生成二氧化碳及氨而揮失，磷、鉀、鈣及鎂等成分在理論上僅有型態之轉化而不易損失，少數可能損失的途徑是經由肥水流失[8]。本研究採用袋式堆積法，堆積體上方表層逢下雨時另加覆蓋防雨塑膠布，顯然有減少肥料成分流失情形之功能。

利用檢測蔬菜種子發芽率，亦可做為判斷堆肥腐熟指標之一[1]。由本研究製作堆積第 30 日稻殼雞糞堆肥之水萃取液(堆肥與水體積比 1：10)進行萵苣及小白菜種子發芽率分析結果顯示(表 3)，播種後第 9 日萵苣幼苗存活率在不同處理間差異不顯著，各處理均可達到 90%以上。播種後第 9 日小白菜幼苗存活率在不同處理間互有差異，其中以 C 處理較高，在播種後第 9 日之小白菜幼苗存活率均可達到 95%以上；其次分別為 D 處理約 93.3-96.7%及 B 處理約 90.0-93.3%；以 A 處理約 81.7-86.7%較低，顯示有接種分離菌株 TCT111 及 TCB10007 等複合菌株處理 C 及 D 的小白菜幼苗存活率較高於未接菌的 A 及 B 處理。

綜合本研究結果，A、B、C、D 各處理在製作堆積第 30 日之萵苣及小白菜種子發芽率均可達到 80%以上；且由圖 1 及圖 2 結果顯示本研究 A、B、C、D 各處理在堆積第 30 日，稻殼雞糞堆肥溫度已降低至 50℃以下，堆肥材料的碳氮比已降至 14.5~16.0，顯然各處理之稻殼雞糞堆肥的分解醱酵已經達到穩定階段。另有接種分離菌株 TCT111 及 TCB10007 等處理 C 及 D 的堆肥最高溫度可以在堆積第 2 日達到 60℃，堆肥材料 C/N 在製作堆積第 30 日內分別降為 14.5 及 15.1，而未接菌處理 A 及 B 的堆肥材料 C/N 在製作堆積第 30 日分別約為 16.0 及 15.8，處理 C 及 D 的小白菜幼苗存活率較高於未接菌的 A 及 B 處理，顯示接種分離菌株 TCT111 及 TCB10007 處理具有增進稻殼雞糞分解醱酵的功效。因此，利用袋式堆積法及接種分離菌株 TCT111 及 TCB10007 處理，將可推廣供農友自行堆積製作稻殼雞糞堆肥之應用

參考，以期取代目前施用生鮮未醱酵禽畜糞之慣行法。

參考文獻

1.今野一男、平井義孝、東田修司 1988 バーク堆肥の腐熟度指標煙地への施用法 日本土壤肥料學雜誌 59: 621-625。

2.周可、謝鳳行、李亞玲、張峰峰 2009 不同微生物菌劑處理對雞糞堆肥發酵的影響 天津農業科學 15(3):10-13。

3.莊作權、張宇旭、陳鴻基 1993 有機質肥料養分供應能力之評估 中華生質能源學會會誌 3-4:132-146。

4.徐大勇、黃為一 2007 人工接種堆肥和自然堆肥微生物區系變化的比較 安徽農業科學 35(23):7219-7220。

5.黃山內 1991 豬糞堆肥在作物生產之利用 p.1-18 豬糞處理、堆肥製造使用及管理研討會論文專輯 台灣省畜產試驗所編印。

6.蔡宜峰、陳俊位 2012 農業廢棄物資源化微生物之研究 農業生技產業季刊 32:52-59。

7.蔡宜峯 陳俊位 陳榮五 2009 落葉廢棄物製作堆肥技術之研究 台中區農業改良場研究彙報 103:53-62。

8.蔡宜峰、莊作權、黃裕銘 1994 堆肥化因子對堆肥營養要素成分含量之影響 p.131-148 堆肥技術及其利用研討會論文集 中華生質能源學會編印。

9.嚴式清 1989 畜牧廢棄物在有機農業之利用 p.245-249 有機農業研討會專集 台中區農業改良場特刊16號。

10.Bremner. J. M., and C. S. Mulvaney. 1982. Nitrogen-total. p.595-624. In: Page, A. L., H. Miller and D. R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2. Academic Press, Inc., New York.

11.Carpenter B. L., A. C. Kennedy and J. P. Reganold. 2000. Organic and biodynamic management: Effects on soil biology. Soil Sci. Soc. Am. J. 64:1651-1659.

12.Harada, Y. 1990. Composting and application of animal wastes. ASPAC/FFTC Extension Bulletin No.311:19-31.

13.Hendrix, P. F., D. C. Coleman and D. A. Crossley, Jr. 1992. Using knowledge of soil nutrient cycling processes to design sustainable agriculture. Integrating Sustainable Agriculture, Ecology, and Environmental Policy 2:63-82.

14.Inoko, A. 1982. The composting of organic materials and associated maturity problems. ASPAC/FFTC Technical Bulletin No.71:1-20.

15.Irshad, M., A. E. Eneji, Z. Hussain and M. Ashraf. 2013. Chemical characterization of fresh and composted livestock manures. J. Soil Sci. and Plant Nutri. 13(1): 115-121.

16.Kundsen. D., and G. A. Peterson. 1982. Lithium, sodium, and potassium. p.225-246. In: Page, A. L., H. Miller and D. R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2. Academic Press, Inc., New York.

17.Lanyon, L. E., and W. R. Heald. 1982. Magnesium, calcium, strontium, and barium. p.247-262. In: Page, A. L., H. Miller and D. R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2. Academic Press, Inc., New York.

18.Nelson, D. W., and L. E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. p.539-579. In: Page, A. L., H. Miller and D. R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2.

Academic Press, Inc., New York.
19.Olsen. S. R., and L. E. Sommers. 1982. Phosphorus. p.403-430. In: Page, A. L., H. Miller and D. R. Keeney (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2. Academic Press, Inc., New York.
20.Singh, Y. P. and C. P. Singh. 1986. Effect of different carbonaceous compound on the transformation of soil nutrients. Ⅰ.Immobilization and mineralization of applied nitrogen. Biol. Agric. Horti. 4:19-26.

表 1.堆肥試驗處理與材料配方(乾重)

Table 1.Treatments and raw materials in composting experiment (dry weight basis)

Treatment	Treated material		
	Rice hull-chicken manure	TCT111 (*Trichoderma* sp.)+ TCB10007(*Bacillus* sp.)[1]	Covered with nonwoven fabric[2]
A	1,150kg	0	No
B	1,150kg	0	Yes
C	1,150kg	360 L	No
D	1,150kg	360 L	Yes

1. 1 kg microorganism (>10^9 CFU/g) diluted with 200 liters water.

2. Polyester, thickness 1.0 mm.

表 2.試驗堆積第 0 及 30 日稻殼雞糞堆肥之主要化學特性分析

Table 2. The main chemical characteristics of rice hull- chicken manure composts at day 0 and 30 after piling

Treat-ment[1]	pH (1:10)	EC (1:10)	OM	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
		(dSm^{-1})	(gkg^{-1})	(gkg^{-1})	(gkg^{-1})	(gkg^{-1})	(gkg^{-1})	(gkg^{-1})	($mgkg^{-1}$)	($mgkg^{-1}$)
Day 0	7.04	4.49	706	24.6	12.9	19.9	22.8	4.04	53.7	269
Day 30										
A	7.38a[2]	4.29a	644a	23.2a	13.5a	20.4a	28.7a	4.80a	57.1a	302a
B	7.28a	4.21a	647a	23.8a	13.7a	19.0a	27.3a	4.32a	54.6a	300a
C	7.29a	4.33a	636a	25.6a	14.4a	20.8a	29.0a	4.71a	56.6a	318a
D	7.30a	4.20a	632a	24.7a	13.8a	19.2a	26.2a	4.18a	55.9a	304a

1. See table 1.

2. Values followed by the same letter within a column are not significantly different at $p<0.05$ level based on Duncan’s Multiple Range Test.

表 3.試驗堆積第 30 日稻殼雞糞堆肥水萃取液(堆肥與水體積比 1：10)進行萵苣及小白菜種子發芽率分析

Table 3. The germination test of *Lactuca sativa* L. and *Brassica chinensis* L. by using the water extracted solution from rice hull- chicken manure at day 0 and 30 after piling (compost /water with 1/10 by volume ratio)

Treatment[1]	*Lactuca sativa* L.		*Brassica chinensis* L.	
	Germination rate[2]	Index	Germination rate[2]	Index
	(%)	(%)	(%)	(%)
Day 0	46.6	-	10.8	-
Day 30				
A	91.7a[3]	100.0	86.7b	100.0
B	95.0a	103.6	93.3ab	107.6
C	93.3a	101.7	100.0a	115.3
D	93.3a	101.7	93.3ab	107.6

1. See table 1.

2. Day 9 after seeded.

3. Values followed by the same letter within a column are not significantly different at $p<0.05$ level based on Duncan's Multiple Range Test.

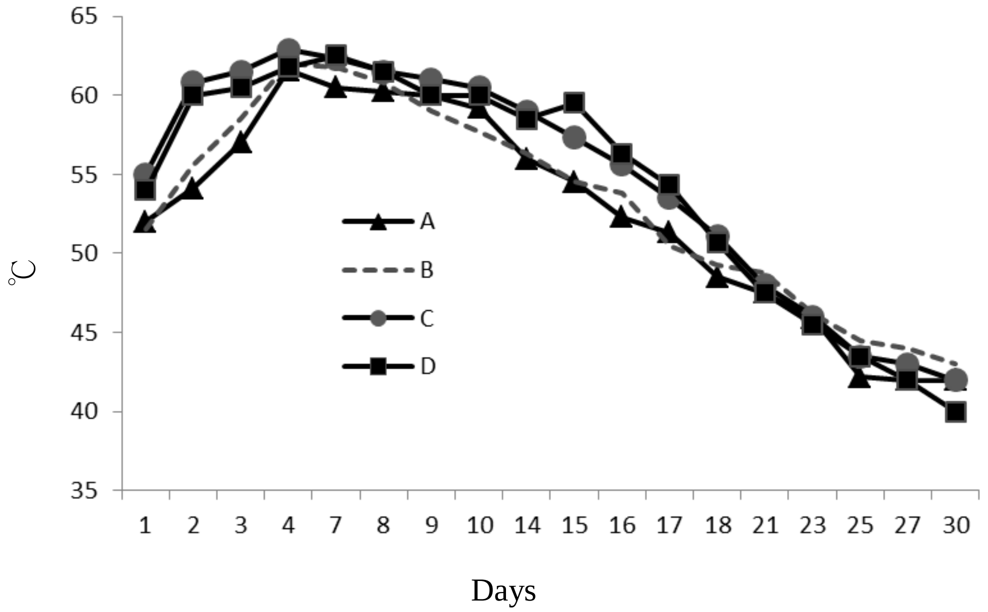


圖 1.稻殼雞糞堆肥製作期間之溫度變化

Fig 1.The temperature variation of rice hull- chicken manure composts during composting process

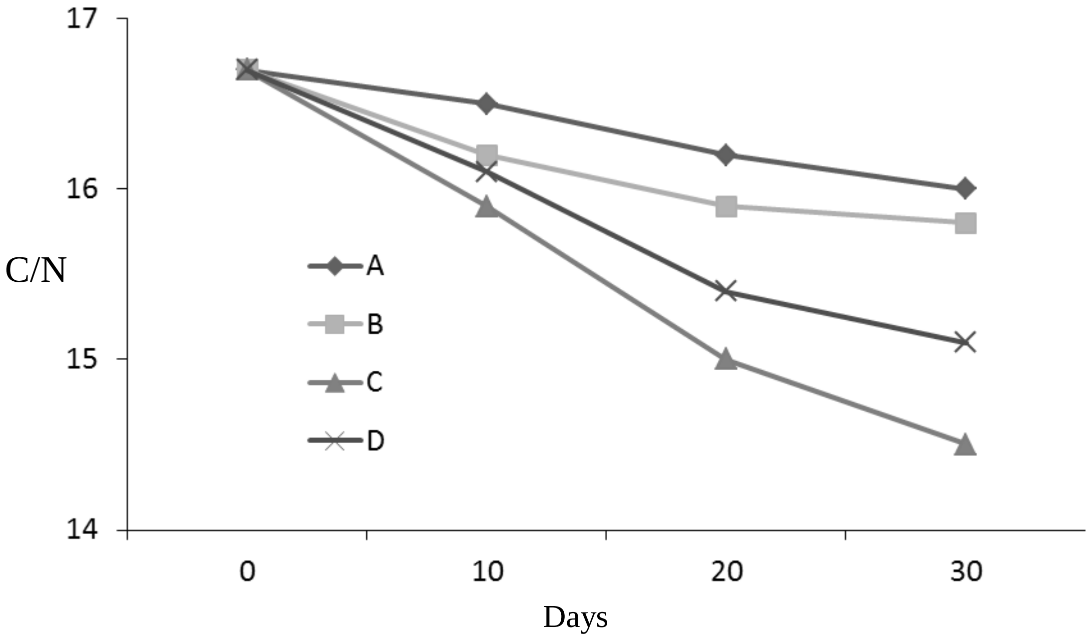


圖 2.稻殼雞糞堆肥製作期間之堆肥 C/N 變化

Fig 2. The C/N ratio variation of rice hull- chicken manure composts during composting process

Research on the Production of Rice Hull- Chicken Manure Compost by Utilizing Beneficial Microorganisms and Bag Stacking

Abstract

The objective of this research is to develop an efficient way in the production of livestock manure compost. Experiment is conducted with A) no inoculation and no cover, B) no inoculation and covered with nonwoven fabric, C) inoculated isolates TCT111(*Trichoderma* sp.), TCB10007(*Bacillus* sp.) and no cover, D) inoculated isolates TCT111, TCB10007 and covered with nonwoven fabric. The main raw material is rice hull- chicken manure and the weight is 1,150 kg in each treatment. The results indicated that the temperature of composts which received C and D treatment could rise to 60℃ at day 2-12 after composting, A and B treatment could rise to 60℃ at day 5-10. And then, the temperature of all treatment would lower to 50℃ at day 21. There was no significant difference in pH, EC, the contents of OM, N, P, K, Ca, Mg, Cu and Zn of rice hull- chicken manure composts given different treatments at day 30 after composting. Among them, the EC, contents of OM and N were decreasing and the pH, contents of P, K, Ca, Mg, Cu and Zn were increasing during composting. At the same time, the C/N ratios of those rice hull- chicken manure composts with A, B, C and D treatment with 16.0, 15.8, 14.5 and 15.1, respectively. The germination rates of the *Lactuca sativa* L. and *Brassica chinensis* L. were measured 83.3-95.0% and 81.7-100%, respectively, by using water solution extracted from those rice hull- chicken manure composts (compost /water with 1:10 by volume ratio). The results showed that those rice hull- chicken manure composts were closed to stable at day 30 in the composting process.

Key words: rice hull- chicken manure, *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., composting

---

1. Researcher (Branch Chief), Puli Branch, Taichung DARES, COA.

2. Assistant Researcher and Associate Researcher of Taichung DARES, COA.

臺東地區重要作物溶磷菌之開發研究

黃文益 [1,2]

摘要

微生物肥料於田間應用時，限制因素之一為土生微生物的競爭，因此篩選適合於當地土文氣候的土生微生物有其發展前景，本試驗於臺東地區各地採集果園根系土壤進行溶磷菌篩選工作，將篩選出的菌株進行溫室盆栽試驗及田間試驗，結果顯示，在溫室短期作物中，澆灌市售溶磷菌能有效提高大部分蔬菜鮮重及株高，本試驗所篩出之菌株 E69 有提升對蔬菜鮮重及乾種有提升但不顯著，在田間試驗的玉米穗重則有顯著提升，本 E69 菌株經 Biolog 鑑定為 Burkholderia dolosa 伯克氏菌屬。

關鍵詞：溶磷菌、篩選、伯克氏菌屬

前言

磷在土壤中多以無機難溶性型態存在，不易為植物吸收，溶磷菌可促進磷的溶解，增加植物根系對磷的吸收。然在農業上的應用，有許多因素使溶磷菌的效能及表現不如預期，其中最主要的因素為溶磷菌在作物根系的定殖能力及與土生微生物的競爭。臺東地區夏季氣候炎熱降雨集中，且為海岸山脈沖積土，在氣候、土壤及作物上均異於北部及西部，有發展本區的溶磷微生物的需求。未來的農業發展在供應作物生長的養分上，為朝向精準合理的使用肥料，其中微生物肥料的使用可降低農業生產成本，提高農民收益，逐漸為社會大眾重視(林和吳，2005)。本試驗主要為從本區土壤中分離出適合臺東地區氣候土壤的優良溶磷菌株，以應用於本區主要作物，提高其品質及產量。溶磷菌的篩選主要為使用含難溶性磷的培養基，如 Pikovskaya medium (Pikovskaya, 1948)，經序列稀釋及塗盤後挑選溶磷圈較大的菌株進行分離純化、測定菌株溶磷能力，進行盆栽試驗及菌株鑑定等(劉等，2005；黃等，2006；Hu et al., 2006；Damarjaya et al, 2005)，以期能篩選有市場潛力的菌株。

材料與方法

1.採取臺東地區果樹根系土壤進行分離並記錄地上作物及植生狀態。

2.溶磷菌分離：取植物根系土壤加入 50 ml 稀釋液中，震盪 30 分鐘，序列稀釋取 10^{-3}~10^{-5} 稀

---

1. 通訊作者

2. 行政院農委會臺東區農業改良場助理研究員

釋液 0.1ml 均勻塗抹在平板培養基，於 28℃培養 2 天。

3.將有明顯溶磷圈之菌株以四分畫法純化後，於 28℃培養 3 天測定溶磷圈直徑(D)及菌落直徑(d)，以(D/d)值大小初步判定菌株溶磷能力。

4.溶磷能力測試：取已知濃度的菌液 2ml 加入 50ml 液體培養基，另以不接種作為對照，3 重複，於 28℃(160 rpm)恆溫震盪培養，以 4800 rpm 離心 15 分鐘，取上清液以鉬藍法測定有效性磷含量。

5.培養基以國家標準局 CNS 15301-3 配製：10g sucrose, 0.27g NH_4NO_3, 0.2g KCl, 0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001g $MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$,磷酸鹽有三種：(1)0.3 g/L 磷酸鈣($Ca_3(PO_4)_2$ (2)0.5 g/L 磷酸鋁($AlPO_4$)及(3) 0.5 g/L 磷酸亞鐵($FePO_4$),固態培養基另加 12 g/L 純化瓊脂, 加水至 1000 ml。

6.溫室盆栽試驗：以空心菜(桃園一號)、莧菜、小白菜(三鳳二號)及綠萵苣(翠花)，進行試驗，發芽 1 週後移植於長型花盆，每處理五重複，分別為處理 1：澆灌市售溶磷菌，處理 2：澆灌篩選菌 E60 及對照 CK，於 10 月 18 日調查株高及鮮重等。

7.田間玉米試驗：以 CRD(完全逢機設計)設置，於生長初期及中期分次澆灌，每株 1 公升，分為處理 A.市售溶磷菌，處理 B.農糧署推廣用溶磷菌，處理 C.本場篩選之溶磷菌(E60) ，處理 D.本場篩選之溶磷菌(E69) E.對照組不施用溶磷菌，每處理 3 重複，以畦為單位，共 15 畦。

8.菌種鑑定：純化後的菌，以四分劃法接種至 BUG 培養基上，培養 24 小時後，接種至 GEN III 96 well microplates 上，於 33℃下培養 24 小時，以 Biolog 鑑定判讀，軟體系統 MicroLog™ system 5.1.01。

結果與討論

一、溶磷菌篩選及鑑定

於臺東地區果園採取果樹根系土壤，序列稀釋後以選擇性培養基選擇透明溶磷圈的菌株(圖 1)，純化後篩選出數株具明顯溶磷圈的菌株(圖 2)，經以 Biolog 初步鑑定結果如表 1，主要為伯克氏菌屬(Burkholderia)，該菌屬為在選擇性培養基最快出現溶磷菌圈的菌種，其菌落周圍光華，顏色乳白至淡黄，菌落周圍出現明顯透明溶磷圈。

二、溶磷能力

經以溶磷圈對菌落的比值選擇數株進行溶磷能力測試，在對難溶性磷酸鈣的結果如表 2，因在前人研究中大部分使用的難溶性磷酸鹽含量為每公升 3~5 克，而標檢局使用量為每公升 0.3~0.5 克，因此在本試驗中使用二種調配濃度，即每公升 0.3~0.5 及 3~5 克的磷酸鹽，在調配過程中也發現即使是僅加入每公升 0.3 克的磷酸鈣亦無法完全溶解,靜置後有沉澱的現象，表 2 為試驗菌株在磷酸鈣液態培養基的溶磷能力，在第一天培養 24 小時後，以市售溶磷菌的溶磷量較高，其餘菌株相較於對照滅菌的磷酸鈣培養基亦有顯著性提高溶液中的磷含量，在第三天及第七天的數據中顯示 E60、E69 及市售溶磷菌表現均優，尤其 E69 有後來居上的趨

勢，E60 及 E69 在第一天至第 3 天之間溶磷量大量上昇，第 3 天至第 7 天之間趨緩，顯示本試驗篩選的菌株在初始時反應較市售菌株慢，但在第 3 天後則能追上溶磷表現，在添加每公升 0.3 克或 3 克磷酸鈣的差異上，可以見到溶磷量有增加，但增加的倍率與添加的倍率無正比關係，應該為該單位體積菌數所能溶解的磷酸鈣有一定量的限制；表 3 為各菌株對磷酸鐵的溶磷能力，結果顯示市售溶磷菌在每公升 0.5 克磷酸鐵的液態培養基有顯著性的提高溶磷量，尤其在第三天時最高，其餘菌株在磷酸鐵上的表現與對照無顯著差異，顯示這些菌株無法溶解磷酸鐵或對磷酸鐵的溶解能力很弱，而添加每公升 5 克磷酸鐵時溶液內的磷含量確實高於添加每公升 0.5 克磷酸鐵；表 4 為各菌株對磷酸鋁的溶磷能力，結果顯示本試驗篩選的菌株 E60、E65 及 E69 對溶解磷酸鋁的能力非常高，不僅顯著高於對照組，且顯著高於市售溶磷菌，顯示本試驗篩選株菌有使用於磷酸鋁豐富的酸性土壤中的潛力。

表 1. Biolog 初步鑑定結果

菌株	鑑定結果
E60	Burkholderia stabilis
E61	Burkholderia vietnamiensis
E62	Burkholderia contaminans
E63	Pantoea cypripedii
E64	Methylobacterium rhodinum
E65	Burkholderia anbifaria/cepacia
E66	Mycobacterium novocastrense/aichiense
E67	Burkholderia contaminans
E68	Burkholderia gladioli
E69	Burkholderia dolosa

表 2. 各菌株對磷酸鈣的溶磷能力

$Ca_3(PO_4)_2$	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.3g	E60	36.80 b	97.77 a	99.00 a
	E65	27.60 b	38.67 c	78.67 b
	E69	13.54 bc	71.20 b	108.87 a
	Commercial	75.87 a	81.87 ab	100.00 a
	CK	5.72 c	4.95 d	5.18 c
3g	E60	55.60 b	88.40 ab	135.84 a
	E65	44.76 b	66.94 b	103.80 b
	E69	33.50 bc	95.40 a	136.93 a
	Commercial	93.54 a	103.20 a	124.50 ab
	CK	25.30 c	27.50 c	26.70 c

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

表 3. 各菌株對磷酸鐵的溶磷能力

$FePO_4$	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.5g	E60	34.13 b	35.20 b	61.33 b
	E65	26.13 b	24.40 b	25.13 b
	E69	24.53 b	27.33 b	22.93 b
	Commercial	64.67 a	121.67 a	101.60 a
	CK	35.33 b	33.73 b	29.64 b
5g	E60	169.67 a	187.87 a	195.67 a
	E65	141.20 a	188.53 a	187.13 a
	E69	142.20 a	179.87 a	192.47 a
	Commercial	152.93 a	191.20 a	208.80 a
	CK	176.67 a	193.93 a	223.93 a

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at $p \leqq 0.05$

表 4. 各菌株對磷酸鋁的溶磷能力

$AlPO_4$	Treatment	Phosphate solubilization (mg/L)		
		Day 1	Day 3	Day 7
0.5g	E60	58.73 a	73.40 b	101.47 b
	E65	39.53 ab	79.20 b	145.40 ab
	E69	68.47 a	125.00 a	179.27 a
	Commercial	13.54 b	25.13 c	41.27 c
	CK	5.36 b	4.68 c	6.52 d
5g	E60	36.60 a	158.93 a	270.60 a
	E65	25.00 a	123.87 b	216.67 ab
	E69	34.50 a	135.64 ab	264.35 a
	Commercial	19.47 a	38.40 c	50.13 b
	CK	24.53 a	25.27 c	27.93 b

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at $p \leqq 0.05$

三、溫室蔬菜試驗

本試驗選用四種生長快速的蔬菜，以溶磷能力較佳的 E69 菌並已與市售溶磷菌為對照進行試驗，於種植一個月後進行調查，表 5 為各菌株對莧菜生長的影響，結果顯示市售溶磷菌對莧菜鮮重及乾重有顯著性提升，在表 6 對萵苣生長的影響方面，各溶磷菌對萵苣株高、根長、鮮重及乾重均無顯著差異，表 7 在對小白菜生長的影響以市售溶磷菌與對照的株高、鮮重及乾重有顯著差異，表 8 對空心菜的影響方面與小白菜一致，市售溶磷菌與對照的株高、鮮重及乾重有顯著差異，四種蔬菜的試驗結果顯示市售溶磷菌對蔬菜生長有促進作用，本試驗所篩選的 E69 對蔬菜生長有影響但不顯著。

表 5. 各菌株對莧菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	16.4 a	20.5 a	9.1 b	4.2 b
Commercial	17.1 a	19.9 a	13.4 a	6.5 a
Soil only	17.0 a	19.4 a	10.6 b	4.9 b

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

表 6. 各菌株對萵苣生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	11.2 a	7.2 a	8.5 a	2.2 a
Commercial	9.9 a	7.6 a	8.9 a	2.3 a
Soil only	9.8 a	7.9 a	8.4 a	2.2 a

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

表 7. 各菌株對小白菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	11.2 b	8.6 a	12.2 ab	3.1 ab
Commercial	15.0 a	8.7 a	18.3 a	4.2 a
Soil only	12.4 b	7.7 a	9.5 b	2.5 b

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

表 8. 各菌株對空心菜生長的影響

Treatment	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Biomass (g/plant)	Dry weight (g/plant)
E69	37.8 ab	41.2 a	34.2 ab	17.9 b
Commercial	39.4 a	39.0 a	38.1 a	19.3 a
Soil only	34.8 b	42.8 a	29.6 b	17.5 b

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

四、田間試驗

在田間試驗方面，本試驗選擇中長期作物食用水果玉米(彩珍)，於幼苗期及生長中期共澆灌菌液 4 次，成熟後採取玉米穗進行分析，結果如表 9，在玉米穗重方面一株僅留一穗，在 E69 及市售溶磷菌 1 號方面與對照有顯著性差異，在甜度方面，E60 反而低於對照，其餘菌種與對照無顯著性差異。

表 9. 各菌株對玉米生長的影響

Treatment	Corn ear weight	Soluble Solid
E60	151.0 b	9.4 b
E69	167.3 a	9.7 ab
Commercial 1	169.7 a	10.5 a
Commercial 2	161.0 ab	10.4 a
CK	151.5 b	10.8 a

Value are mean of three replications,mean values sharing the same letter do not differ significantly by LSD at p≦0.05

結論

本試驗篩選的 E69 菌株在溫室的試驗方面對蔬菜的生長影響雖有提昇但效果不顯著，在田間試驗的玉米穗重則有顯著提升，由於蔬菜僅澆灌一次，玉米則澆灌四次，且本菌株的效用由溶磷能力試驗得知其反應速度不及市售溶磷菌，因此或許在改變澆灌方式，如增加澆灌次數及澆灌濃度後可得顯著差異。

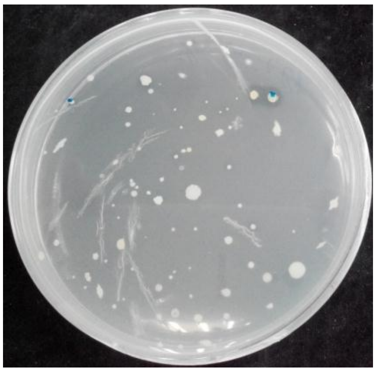


圖 1. 溶磷菌的篩選，在序列稀釋後選取具明顯透明溶磷圈的菌株。

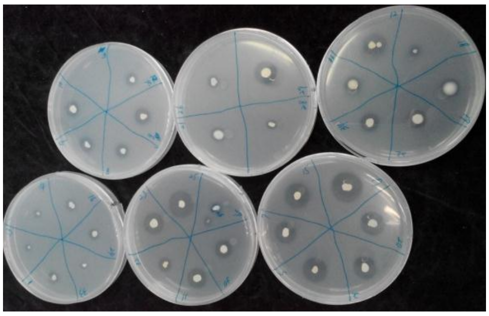


圖 2. 由溶磷圈的大小初步篩選有潛力的溶磷菌。

圖 3. E69 以營養培養基(NB)於 30℃下在 10 公升發酵槽 24 小時即可培養出≧10^8CFU 的溶磷菌。

參考文獻

1.江晃榮。1993。農業生物技術。324-340。臺北：國立編譯館。

2.黃偉、黃欠如、胡鋒、吳洪生、李輝信。2006。 紅壤溶磷菌的篩選及溶磷能力的比較。生態與農村環境學報 22(3)：37-40。

3.劉曉芳、任鵬、孔健、黃曉東。2003。土壤中溶磷微生物的篩選。山東商業職業技術學院學報 3：3。

4.Damarjaya, D. I., J. Widada, K. Senoo, M. Nishiyama, and S. Otsuka.2005. Mineral phosphate solubilizing bacteria isolated from variousplant rhizosphere under different aluminum content. Indonesian Journal of Biotechnology 10(2)：814-821.

5.Hu X., J. Chen, and J. Guo. 2006. Two phosphate- and potassium solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22：83–990.

Development and Application of Phosphate-solubilizing Bacteria in Taitung Area

Wen-Yi Huang[1,2]

Abstract

When using microbial fertilizer in the field, one of the reasons for the remarkable efficacy is not easy to compete native microbes, so screening suitable soil microbes for the local climate and soil has its development prospects,We collected the soil around the roots and screening PSB (phosphorus solubilizing bacteria) in Taitung area orchards, and tests PSB ability in greenhouse and field. The result shows that commercially PSB can effectively improve some vegetables fresh weight and height, E69 strain have no significant in vegetable trials, but have significantly at improved corn ear weight in field trials, this E69 strain was identified as Burkholderia dolosa by Biolog.

Key word: Phosphate-solubilizing bacteria. Screening. Burkholderia.

---

1. Corresponding author.
2. Assistant Researcher, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

羽毛分解菌應用於微生物肥料之開發研究

曾宥綋 [1,2] 郭雅紋 [2] 陳鴻堂 [2]

摘要

本研究篩選具溶磷能力之羽毛分解菌株，經 16S rDNA 序列分析其菌株 TCC-2 及 TC4-1C 屬於節桿菌屬 (Genus *Arthrobacter*)，而菌株 PiA 則屬於巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*)。菌株 TCC-2、TC4-1C 及 PiA 經培養於 1%羽毛之礦物鹽培養基 (BHF medium)至第 4 天，其羽毛分解率分別為 65.3%、62.9%及 44.3%，且羽毛分解液之 pH、EC、銨離子及全氮含量皆明顯提升。篩選之菌株具有溶解磷礦石粉與磷酸三鈣之能力，其中以菌株 PiA 溶解磷酸三鈣能力較佳 (71.3 mg/L，培養 4 天)，而菌株 TC4-1C 溶解磷礦石粉能力較佳 (5.04 mg/L，培養 4 天)。菌株 TCC-2 及 TC4-1C 可於 3% 氯化鈉濃度下生長，其中菌株 TC4-1C 可於 1%台肥即溶 5 號 (10-20-20)中有效分解羽毛，具有應用生成高養分有機液肥之潛力。篩選之 3 菌株皆可於磷礦粉及草木灰之培養基中分解羽毛，可應用於有機農業之養分補充。

關鍵詞:羽毛分解菌、溶磷菌、有機液肥

前言

氮為作物生長所需，有機栽培常以海鳥糞或豆粕做為氮肥補充，然而因價格高昂，羽毛可做為替代氮源，提供作物所需氮素 (Hadas and Kautsky, 1994)，然而因羽毛角蛋白質含量豐且其雙硫鍵多結構緊密，因此不易分解，無法快速釋放氮素供作物利用，另應用於飼料添加之研究指出，以高溫高壓處理羽毛以作為飼料添加，常因胺基酸結構破壞，如 methionine、lysine 及 tryptophan 易受破壞，而導致其作為飼料添加之營養價值減損 (Wang and Parsons, 1997)。微生物轉換羽毛廢棄物將可避免胺基酸遭破壞，可提高飼料添加之價值或作為相對速效之氮質肥料施用 (Bertsch and Coello, 2005; Choi, and Nelson, 1996; Gupta and Ramnani, 2006; Hadas and Kautsky, 1994; Kim et al., 2005; Onifade et al., 1998)。

磷為作物生長所需之必要元素，然因磷肥施用至土壤後易導致磷酸鈣、磷酸鋁及磷酸鐵沉澱而降低磷之植物有效性 (Alam and Ladha, 2004; Vassilev and Vassileva, 2003)，若因磷之植物有效性低而大量施用磷肥，則會導致施肥成本增加且造成環境汙染 (Reddy et al., 2002)。溶磷菌可經由產酸、鉗合及氧化還原等作用而溶解難溶性磷(Chung et al., 2005; Gulati et al.,

1.通訊作者

2.農委會臺中區農業改良場助理研究員、助理研究員、助理研究員

2010)。近來由於肥料價格高漲及其他產業對磷礦的需求增加，如食物防腐添加、殺真菌劑應用、製陶業、冶金業等，使得高品質磷礦分配至農業應用的機會降低，因此以溶磷菌進行土壤磷之溶出以提高作物利用率，有利於達農業之永續發展 (Gyaneshwar et al., 2002)。

材料與方法

具溶磷能力之羽毛分解菌株之篩選

本研究採取中興大學中興湖周邊之土壤，添加10 g土壤於95 ml含有1% 雞羽毛 (取自興中台股份有限公司)、及0.5%磷酸三鈣 (Calcium phosphate tribasic, KATAYAMA) 之去離子水中，經室溫培養5天後以十倍連續稀釋塗抹於BHF (1% 羽毛， w/v) 固態培養基中，BHF培養基為參考BH基本礦物鹽培養基 (Bushnell and Haas, 1941)，並經修改其配方為每1L去離子水含有 1 g 磷酸氫二鉀、1 g 磷酸二氫鉀、0.2 g 硫酸鎂 (含7個結晶水)及0.02 g 氯化鈣並添加1% (w/v)之羽毛。羽毛先經由刀片切割機切割約20秒後備用。經培養3-5天後，進行純化培養並挑選單一菌落接種至液態磷酸三鈣或磷礦石粉 (Rock-P, CCM FERTILIZER Sdn Bhd) 培養基，經培養4天後以鉬藍法 (Watanabe and Olsen, 1965)進行水溶性磷含量分析，以篩選溶磷菌株並分析其溶磷量。磷酸三鈣培養基及磷礦石粉培養基之配方參照肥料檢驗方法 (方法編號AFS3183-1)。接種篩選之溶磷菌株單一菌落至BHF液態培養基中，於室溫培養4天後觀察羽毛分解狀況，以篩選出具溶磷能力之羽毛分解菌。上述培養基以高溫高壓滅菌20分鐘後備用。固態培養基配製則添加17 g/L 洋菜膠。

篩選之菌株16S rDNA基因序列分析

篩選菌株接種於5 mL NB (nutrient broth, Difco) 培養基中，於室溫培養24小時後，以MO BIO 公司之商業套組 (UltraClean^{TM} Microbial Genomic DNA isolation Kit, MO BIO Laboratories, INC., USA) 進行細菌 DNA 萃取。抽取之DNA以引子1F (5’ GAG TTT GAT CAT GGC TCA G 3’)及9R (5’ AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA 3’) (Kämpfer et al., 2003; Shen et al., 2005) 進行PCR以放大16S rDNA。委外進行定序分析，取得序列後於 GenBank (NCBI) 進行序列比對，以初步確認篩選菌株之菌屬。

篩選菌株之耐鹽能力分析

菌株耐鹽能力分析以配製1%、2%、3%、4%、5%及6%之氯化鈉之NB (nutrient broth)培養基，經接種單一菌落培養18小時後測定其培養液之OD600值。

羽毛分解率及分解液之pH、EC、元素養分分析

本研究接種篩選菌株之單一菌落於50 mL羽毛培養基 (BHF)中，於30℃及120 rpm 震盪培養4天後進行分析。其培養液經預先以70℃烘乾至恆重之Whatman No.1濾紙過濾後，其濾液以電極分析pH及EC，銨態氮及全氮以微量擴散法測定 (Keeney and Nelson, 1982)，鉀以火焰光度計測定 (Sherwood flam photometer 410)，磷以鉬藍法測定 (Watanabe and Olsen. 1965)而鈣

及鎂則用原子吸收光譜儀 (Hitachi Polarized Zeeman Atomic absorption spectrophotometer Z-5000) 分析。濾紙上殘留羽毛經70℃烘乾至恆重後秤重，經與對照處理 (未接菌之羽毛培養基) 之殘留重量比較後，計算羽毛分解率。以上處理皆以3重複進行試驗。並分析羽毛於不同資材中之分解率及濾液元素養份分析。

結果與討論

本研究篩選 3 株具溶磷能力之羽毛分解菌株，經 16S rDNA 序列分析，其中菌株 TCC-2 及 TC4-1C 屬於節桿菌屬 (genus *Arthrobacter*)，而菌株 PiA 經 16S rDNA 序列分析及委託食品工業發展研究所進行菌種鑑定為巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*)，另 2 菌株之菌種仍在食工所分析中。此 3 菌株於磷礦石粉固態培養基中可顯示出透明環 (圖 1)，於磷酸三鈣及磷礦石粉液態培養基之溶磷能力如表一，以菌株 PiA 溶解磷酸三鈣效果較佳而菌株 TC4-1C 溶解磷礦石粉能力較佳。菌株培養於基本礦物鹽羽毛培養基之羽毛分解率分析 (表二)，顯示以節桿菌屬之菌株 TCC-2 及 TC4-1C 之羽毛分解能力較佳，其羽毛分解液之 pH、EC、銨離子及全氮含量皆明顯提升，顯示菌株可以羽毛為碳及氮源，並逐步分解羽毛角蛋白質。菌株耐鹽特性分析顯示菌株 TCC-2 及菌株 TC4-1C 可於 3%氯化鈉 NB 培養基中生長，其 OD600 值與不添加氯化鈉者相近，顯示於此氯化鈉濃度下不影響菌株本身生長特性，其中以菌株 TCC-2 之耐鹽能力最佳，於 6% 氯化鈉之培養基中，其 OD600 值仍有 1.5，其次為菌株 TC4-1C 而菌株 PiA 則於 1%氯化鈉培養基中生長明顯受抑制，於 3%氯化鈉濃度下則完全無法生長，不具耐鹽能力 (圖 2)，顯示菌株 TCC-2 及 TC4-1C 具有應用於與化學肥料混合施用之潛力，另經研究發現菌株 TC4-1C 可於 1%台肥即溶 5 號培養基中有效分解羽毛 (表三)，以羽毛作為碳源，並在含可溶性氮源情況下有效分解羽毛，可應用於生成高養分並富含胺基酸之液肥，有利提高此菌株於田間之應用性，推測此耐鹽菌於田間高化肥濃度培養環境下亦具有降低雜菌影響之效果，有助於此菌株功能之表現。另此 3 菌株皆可於 1%羽毛 0.5%磷礦粉及 0.5%草木灰中分解羽毛 (表四)，可生成適用於有機栽培之液肥，推測可藉由菌株之蛋白質分解能力及溶磷能力，提高有機栽培中豆粕之分解率及土壤溶磷效果。本研究篩選之菌株可應用於羽毛轉化再利用並以菌株本身之溶磷能力，提高土壤磷肥有效性，達到農業環境資源永續利用之目標。

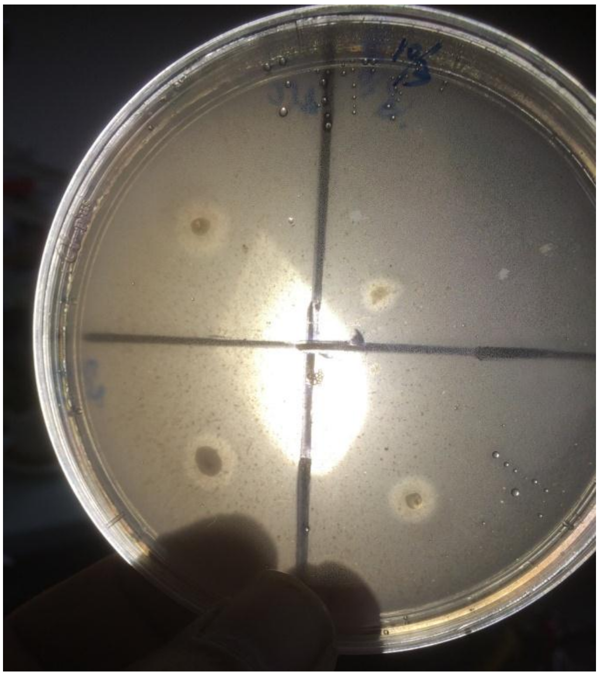


圖 1.篩選菌株於磷礦石粉培養基之溶磷狀況，左上為菌株 TC4-1C、右上為菌株 PiA、左下為菌株 TCC-2

Fig. 1. Isolates inoculated in the rock phosphate medium, top left is TC4-1C, top right is PiA and down left is TCC-2

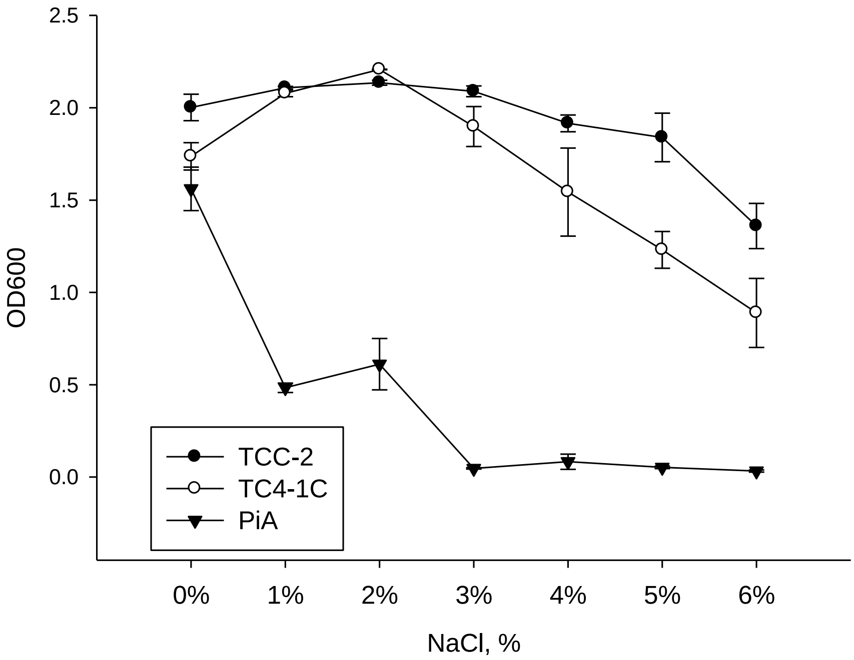


圖 2.篩選菌株於不同氯化鈉濃度 (%)之 NB 培養基中，經培養 18 小時之 OD600 吸光值

Fig. 2. The OD600 value of nutrient broth medium contained different concentration of NaCl after inoculation of the isolates.

表 1.菌株經培養於磷酸三鈣及磷礦石粉培養基至第 4 天之溶磷能力分析

Table1. The solubilization analysis of phosphate by incubation of the isolates in calcium phosphate and rock phosphate medium at the fourth day.

Isolates	Ca-P (mg/L)	R-P (mg/L)
TCC-2	8.51±0.007	2.34±0.22
TC4-1C	17.50±0.36	5.04±0.34
PiA	71.33±8.60	2.45±0.18

表 2.菌株於基本礦物鹽羽毛培養基 (BHF)至第 4 天之羽毛分解液成分分析及羽毛分解率

Table2. The feather degradation rate and nutrient analysis of filtrate by incubation of the isolates in the BHF medium at the fourth day.

Isolates	pH	EC	NH4+ (mg/L)	Tot-N (%)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	Degradation rate %
C-2	8.32 ±0.06	4.09 ±1.11	535.95 ±38.25	0.55 ±0.015	533.43 ±11.92	767.5 ±13.44	1.8 ±0.14	4.7 ±0.57	65.3±0.7
4-1C	8.39 ±0.15	4.04 ±1.04	534.45 ±6.43	0.54 ±0.001	418.28 ±72.37	750.9 ±0.14	1.6 ±0.14	1.6 ±0.64	62.9±3.4
PiA	7.99 ±0.05	3.37 ±0.84	383.67 ±26.58	0.40 ±0.032	562.26 ±62.71	748.8 ±11.03	1.5 ±0.14	1.3 ±0.25	44.8
BK	6.78 ±0.04	1.69 ±0.59	11.4 ±0.85	0.014 ±0.001	413.50 ±7.78	717.6 ±41.65	1.85 ±0.35	17.4 ±0.14	-

表 3.菌株培養於 1%台肥即溶 5 號、1%羽毛、0.5%草木灰至第 4 天之羽毛分解液成分分析及羽毛分解率

Table3. The feather degradation rate and nutrient analysis of filtrate by incubation of the isolates in the 1% feather, 1% instant water soluble fertilizer #5 (10-20-20) and 0.5% plant ash medium at the fourth day.

Isolates	pH	EC	NH4+ (mg/L)	Tot-N (%)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	Degradation rate %
C-2	7.89	16.32	1324	1.330	703.8	2565.0	0.2	0.2	11.13
4-1C	8.39 ±0.01	17.3 ±0.21	1571.5 ±6.36	1.51 ±0.09	749.5 ±88.6	2730.3 ±40.3	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	35.65 ±7.86
PiA	7.68	16.18	1252	1.203	881.2	2633.4	0.2	0.3	2.96
BK	7.15	14.89	1081	1.061	680.2	2542.2	0.3	6.8	-

表 4.菌株培養於 1%羽毛、0.5%磷礦石粉及 0.5%草木灰至第 4 天之羽毛分解液成分分析

Table4. The nutrient analysis of filtrate by incubation of the isolates in the 1% feather, 0.5% rock phosphate and 0.5% plant ash medium at the fourth day.

Strains	pH	EC	NH4+ (mg/L)	Tot-N (%)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)
C-2	8.6 ±0.02	4.30 ±0.50	205.33 ±41.79	0.274 ±0.037	8.22 ±0.87	1218.4 ±122.7	5.53 ±1.80	3.77 ±0.64
4-1C	8.75 ±0.01	4.54 ±0.60	249.67 ±32.31	0.32 ±0.001	9.53 ±0.30	1232 ±83.5	2.83 ±0.25	3.67 ±0.06
PiA	8.5 ±0.17	4.38 ±0.40	205.0 ±24.25	0.25 ±0.04	8.37 ±2.18	1255.8 ±55.9	5.37 ±2.98	4.47 ±1.42
BK	8.85 ±0.25	3.27 ±0.39	12.00 ±2.00	0.052 ±0.016	5.82 ±0.26	1228.9 ±105.8	2.43 ±1.01	2.90 ±2.14

參考文獻

1. Alam, M. M. and J. K. Ladha. 2004. Optimizing phosphorus fertilization in an intensive vegetable-rice cropping system. Biol. Fertil. Soils 40:277-283.
2. Bertsch, A. and N. Coello. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. Bioresour. Technol. 96:1703-1780.
3. Bushnell, L. D. and H. F. Haas. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol. 41:653-73.
4. Choi, J. M. and P. V. Nelson. 1996. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. Using poultry feathers. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121:634-638.
5. Chung, H., M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho, and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil. Boil. Biochem. 37:1970-1974.
6. Gulati, A., N. Sharma, P. Vyas, S. Sood, P. Rahi, V. Pathania, and R. Prasad. 2010. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. Arch. Microbiol. 192:975-983.
7. Gupta, R. and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70:21-33.
8. Gyaneshwar, P., G. Naresh Kumar, L. J. Parekh, and P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil 245:83-93.
9. Hadas, A. and L. Kautsky. 1994. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. Fertil. Res. 38:165-70.

10. Kämpfer, P., U. Dreyer, A. Neef, W. Dott, and H. J. Busse. 2003. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. Int J Syst Evol Microbiol 53: 93–97.
11. Keeney, D. R. and D. W. Nelson. 1982. Nitrogen-Inorganic Form. P. 659-663. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd edition.(Page A. L., R. H. Miller and D. R. Keeney,eds.) ASA, Madison, Wisconsin,
12. Kim, J. M., Y. M. Choi, and H. J. Suh. 2005. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus Pumilus* KHS-1. J. Microbiol. Biotech. 15:472-476.
13. Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam and S. Al-Zarban. 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresour. Technol. 66:1-11.
14. Reddy, M. S., S. Kumar, K. Babita, and M. S. Reddy. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. 84:187-189.
15. Shen, F. T., P. Kämpfer , C. C. Young, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2005. *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1301–1304.
16. Vassilev, N. and M. Vassileva. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:435-440.
17. Wang, X. and C. M. Parsons. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. Poultry Sci. 76: 491-496.
18. Watanabe, F. S. and S. R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and $NaHCO_3$ extracts from soil. Soil. Sci. Soc. Am. J. 29:677-678.

Application of Feather-Degrading Bacteria in Development of Biofertilizer

You-Hong Zeng[1,2], Ya-Wen Kuo[2], and Hong-Tang Chen[2]

Abstract

The dual function bacteria possessed feather degradation and phosphate solubilization were isolated as *Arthrobacter* sp. TCC-2, *Arthrobacter* sp. TC4-1C and *Bacillus megaterium* PiA by 16S rDNA sequence analysis. The feather degradation rate by incubation of isolates TCC-2, TC4-1C and PiA in the BHF medium at the fourth day were 65.3%, 62.9% and 44.3% respectively and the pH, EC, NH_4^+ and total-N in the feather hydrolysates were significantly increased compared with no inoculated ones . Among the three phosphate-solubilizing bacteria, the isolate PiA showed higher phosphate solubilization ability from the calcium phosphate (71.3 mg/L after incubated 4 days) and the isolate TC4-1C showed higher phosphate solubilization ability from the rock phosphate (5.04 mg/L after incubated 4 days). Isolates TCC-2 and TC4-1C can grow in the 3% NaCl nutrient broth medium and the isolate TC4-1C can efficiently degrade feather in 1% instant waster solube fertilizer #5 (10-20-20) medium, showed TC4-1C can be used to produce high nutrient contents of organic liquid fertilizer. The feather also can be degraded by the three isolates in rock phosphate and plant ash medium for applying in the nutrient amendment in the organic farming system.

Key words: Feather-degrading bacteria, phosphate-solubilizing bacteria, organic liquid fertilizer

---

1. Corresponding author.
2. Assistant researcher, Taichung District Agricultural Research and Extension Station, COA.

羽毛分解菌之篩檢技術

林良怡[1]、陳曉萱[1]、陳淑娟[1]、羅致逑[2,3]

中文摘要

本研究於農業環境中篩選到4株羽毛分解菌，對於4克羽毛分解力為75.5% - 80.3%。各羽毛分解液pH值由pH 7.2升至8.2 - 8.9。其中1株菌株所得到之羽毛粉消化率為81.9%。

關鍵詞：羽毛、角蛋白酶、羽毛分解率

前言

由於現代化大規模的家禽養殖業生產大量羽毛廢棄物。據統計羽毛類廢棄物於 102年有27,003公噸，103年有 27,804公噸，羽毛廢棄物在環境中的累積日益增多，已成為固體廢棄物處理問題的一部分。羽毛的主要成分是角蛋白，國內外有許多研究探討羽毛廢棄物之利用性。如 Choi與Nelson (1996) 利用水解羽毛粉作為緩效性氮肥，Ramakrishnan *et al.* (2011) 利用羽毛粉製作微生物培養基。Grazziotin *et al.* (2006) 認為細菌分解羽毛的產物可做為動物飼料；Yong *et al.* (2013) 亦提及分解羽毛釋出之養份可增加飼料養分或作為肥料使用。本研究自農業環境中篩選具分解羽毛能力之菌株，以探討廢棄羽毛在農業肥料及畜牧飼料之應用性。

1. 農業藥物毒物試驗所研究助理
2. 農業藥物毒物試驗所研究員
3. 通訊作者. E-mail: lcc@tactri.gov.tw

材料與方法

一、供試菌株

1. 環境分離菌株：自行分離菌株。
2. 參考菌株：自食工所購買標準菌株 *Bacillus licheniformis* BCRC14353 及 *B. licheniformis* BCRC11594。

二、羽毛來源：福壽公司提供之白肉雞羽毛。

三、培養基

1. 1%酪蛋白磷酸緩衝液： 0.7 g/L KH_2PO_4，1.4 g/L K_2HPO_4，0.5g/L NaCl， 0.1 g/L $MgSO_4$，10 g/L casein，pH 7.2，15 g/L agar (Cai *et al.*, 2008)。
2. 2%羽毛磷酸緩衝液： 0.7 g/L KH_2PO_4，1.4 g/L K_2HPO_4，0.5g/L NaCl，0.1 g/L $MgSO_4$，pH 7.2及雞羽毛(整根、2%)。
3. 其他培養基：Luria-Bertani agar (LA)、Luria-Bertani broth (LB)。

四、羽毛分解菌之篩檢

1. 第一階段（酪蛋白分解力比較）

將供試菌株以LA培養基活化 20小時後，以滅菌牙籤沾取單一菌落，點於酪蛋白培養基上，於 37 ℃培養 24小時後，計算透明環與菌落比。

2. 第二階段（單根羽毛分解力比較）

配製羽毛磷酸緩衝液並分裝 10 mL於螺旋式管中，添加一根完整羽毛，高溫高壓滅菌後備用。添加適量菌量至試管中，於 37 ℃下培養 6天後觀查羽毛的完整性。

羽毛分解力共分為0級至4級。0級(無明顯分解情形)，1級(部份分解，只有少許羽毛碎屑懸浮)，2級(羽毛明顯分解，且碎屑沉澱量多)，3級(羽毛呈粉碎狀，無法看出羽毛原本形狀)，4級(羽毛完全分解沒有殘留)。

3. 第三階段（4克羽毛分解力比較）

配製 200 mL之羽毛磷酸緩衝液，並添加 4 g (2 %)羽毛於500mL三角瓶中，高溫

滅菌後，加入適量菌液於37℃、150 rpm、暗室下培養6天後，計算羽毛分解率(%)。

$$羽毛分解率(\%)=\frac{初始重(g)-殘留重量(g)}{初始重(g)}\times 100(\%)$$

五、羽毛分解液成分分析

1. 可溶性蛋白分析

以Bradford(1976)方法進行。吸光值以OD_{595} 測量。用來製作檢量線的標準品為：BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma USA) 標準液 (貯存液2 mg/mL)，BSA標準曲線配製濃度為5 µg/mL、10µg/mL、15µg/mL、20µg/mL及25µg/mL。

2. 角蛋白酶活性分析

取0.2 mL經適當稀釋之分解液，加入0.8mL 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)含有5mg keratin azure之溶液，充分混勻，於 50℃下反應 60 min後加入 0.2 mL 10% TCA終止酵素反應。再以 4℃，10000 rpm 離心 10 min，取上清液以 595 nm測定吸光值。角蛋白酶之酵素活性定義（U）：使 595 nm吸光值增加 0.01/小時者稱為一酵素活性單位 (Letourneau *et al.*, 1998)。

結果與討論

一、羽毛分解菌之篩檢

1. 第一階段：酪蛋白分解力比較

自環境樣本中進行具酪蛋白水解酶之能力。再自當中挑選透明環/菌落比值大於兩株專利菌株者，進行羽毛分解力之分析（圖1）。

2. 第二階段：單根羽毛分解力比較

得到羽毛分解能力3級至4級之分離菌共59株，進行下一階段4克羽毛分解試驗。

3. 第三階段：4克羽毛分解力比較

2號菌株對羽毛分解率高於二專利菌株(表1)。3號菌株羽毛分解液之角蛋白酶活性高於二專利菌株(表1)。培養 6天後消化液的pH值由7.2升至 8.7 - 8.9(表1)、8.2 - 8.5(表1)。

Suntornsuk, W.與L. Suntornsuk(2003)曾利用 1 %、3 %及 5 %等不同羽毛添加量培養 *Bacillus* sp. FK46，認為羽毛分解菌的分解率隨羽毛添加量的增加而降低。Cheng *et. al*(1995)的研究亦指使用*B. licheniformis* PWD-1分解菌，在羽毛量為1 %時的蛋白酶活性最大。Suntornsuk, W.與L. Suntornsuk(2003)研究亦提出在pH 9時，羽毛分解菌之生長、羽毛分解率及角蛋白活性均最大。本研究結果顯示此4株羽毛分解菌之分解液pH值由pH 7.2升至8.2 - 8.9之間。

4. 角蛋白酶活性比較

本研究試驗菌株所得之粗酵素角蛋白酶活性再與相同方法之文獻(Nagal 2010, Cai *et al.*, 2008) 比較效果，顯示篩選出具有羽毛分解力之環境分離菌株可再進一步探討其應用性(圖2)。

結論

本研究結果顯示自環境中得到之分離株可分解羽毛，將續探討用於飼料的營養添加或肥料的可行性。

引用文獻

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Vol.72:248-254.

Cai, C. G., B. G. Lou, and X. D. Zheng. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 9(9):713-720.

Cheng, S. W., H. M. Hua, S. W. Shena, H. Takagia, M. Asanoab, and Y. C. Tsai, 1995. Production

and Characterization of Keratinase of a Feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(12)：2239-2243.

Choi, J. M. and P. V. Nelson, 1996. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. using poultry feathers. J. Am. Soc. Hortic. Sci . 121(4):634-638.

Grazziotin, A., F. A. Pimentel, E. V. de Jong, and A. Brandelli, 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Animal Feed Sci. Technol. 126:135-144.

Letourneau, F., V. Soussotte, P. Bressollier, P. Branland, and B. Verneuil, 1998. Keratinolytic avtivity of *Streptomyces* sp. S.K1-02 a new isolated strain. Lett. Appl. Microbiol. 26(1):77-80.

Nagal, S., and P. C. Jain. 2010. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. Braz. J. Microbiol. 41: 196-200.

Ramakrishnan, J., H. Balakrishnan, S. T. K. Raja, N. Sundararamakrishnan, S. Renganathan, and V. N. Radha. 2011. Formulation of economical microbial feed using degraded chicken feathers by a novel *Streptomyces* sp. mitigation of environmental pollution. Braz. J. Microbiol. 42:825-834.

Suntornsuk, W., and L. Suntornsuk. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. Bioresour. Technol. 86:239-243.

Tiwary, E, and R. Gupta. 2012. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. J. Bioprocess. Biotech. 2 (4):1-5.

Yong, B., B. Q.Yang, and H. Feng, 2013. Efficient degradation of raw chicken feather into soluble peptides and free amino acids by a newly isolated *Bacillus subtilis* S1-4. Res. J. Biotechnol. 8(9):48-55.

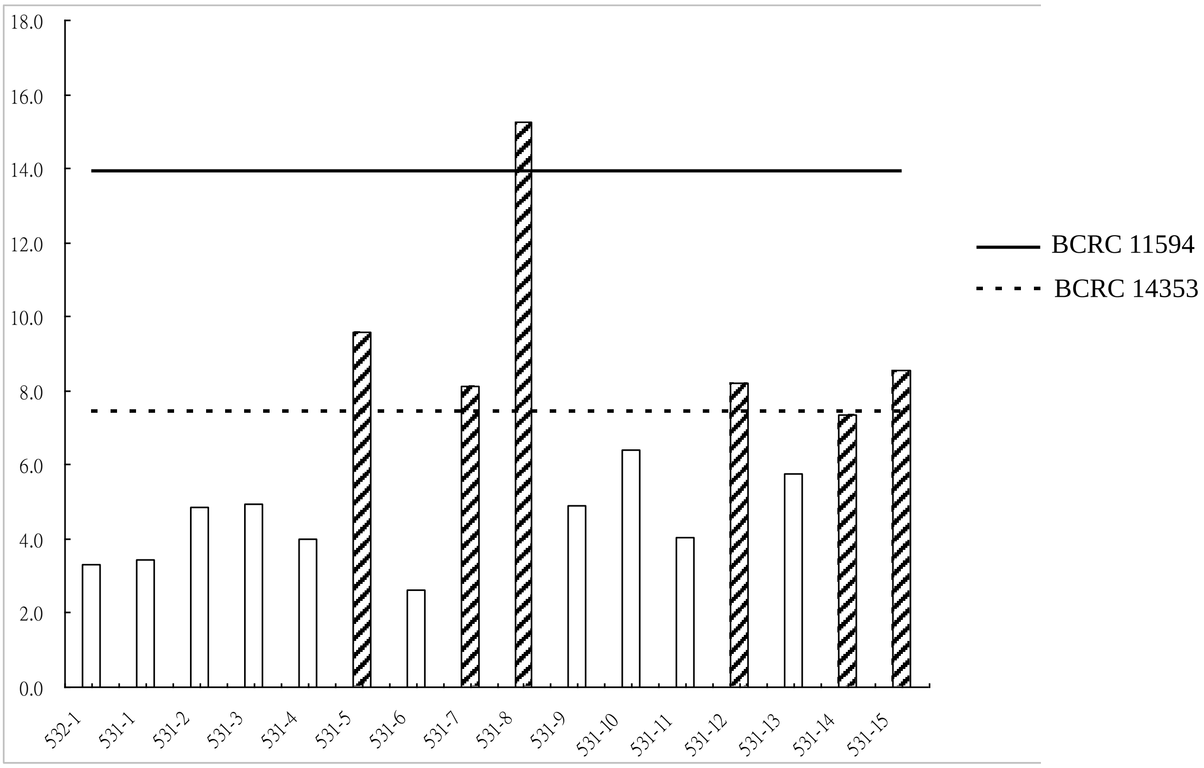


圖1、分離菌株在酪蛋白培養基上之透明環與菌落之比值。

Fig. 1 Halo : colony ratio of bacterial isolates in casein agar-medium.

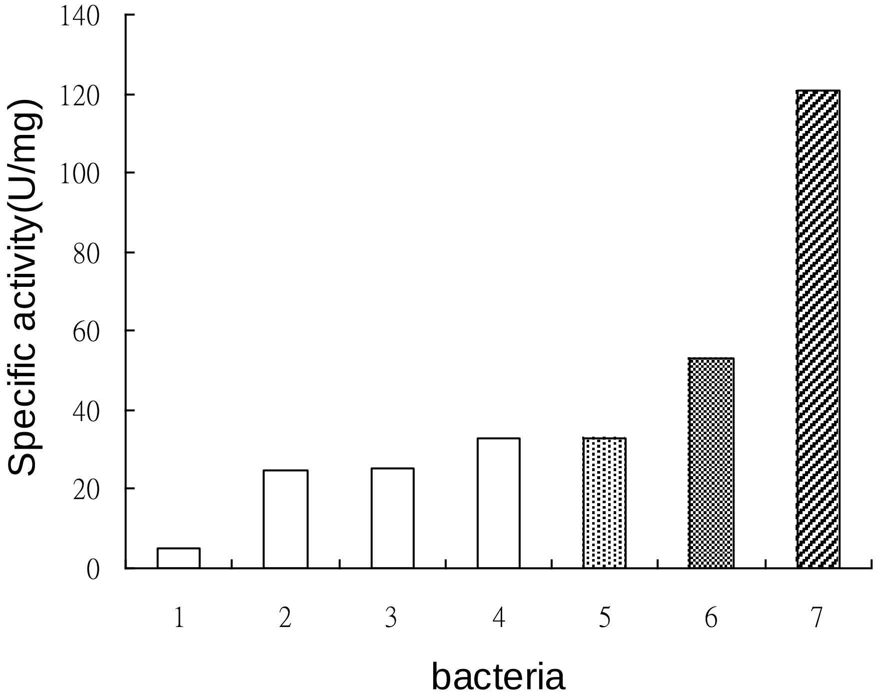


圖2.角蛋白酶比活性之比較。1-4：文獻值，5：BCRC 143553，6：BCRC 11594，7：研究室菌株。

Fig. 2 Comparison of keratinase specific artivities. 1-4: cited from references. ; 5: BCRC 143553 ; 6：BCRC 11594; 7：lab isolate.

表1.不同分離菌株對4克羽毛分解後之pH、分解率、可溶性蛋白及角蛋白酶活性之比較。

Table 1. The pH, feather degradation, soluble protein, and keratinase activity of different bacterial isolates incubated with 2 % chicken feather after 6 days.

Degradation solution	pH	Degradation rate (%)	Soluble protein (μg mL-1)	Keratinase activity (U mL-1)
Blank z	6.9 ± 0.0	7.6 ± 4.2	25.1 ± 1.3	0.0 ± 0.0
BCRC11594	8.3 ± 0.1	74.1 ± 6.3	495.1± 1.5	156.4 ± 9.7
BCRC14353	8.5 ± 0.1	66.0 ± 4.8	376.3 ± 62.6	147.6 ± 4.5
1 [y]	8.4 ± 0.1	75.8 ± 7.5	303.3 ± 55.2	155.3 ± 3.6
2 [y]	8.4 ± 0.1	80.3 ± 3.2	449.3 ± 56.8	82.7 ± 2.9
3 [y]	8.2 ± 0.0	75.5 ± 4.1	246.4 ± 61.4	167.7 ± 5.4
4 [y]	8.4 ± 0.1	78.7 ± 5.5	239.1 ± 60.2	73.7 ± 6.7

[z]：no bacteria

[y]：bacteria isolates.

Screening of Feather Degrading Bacteria From Environment.

Liang-Yi Li [1], Shiao-Hsuan Chen [1], Shu-Chuan Chen [1], and Chi-Chu Lo*
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture,
11, Kuang-Ming Road, Wufong, Taichung County, Taiwan, ROC.

Abstract

The feather degradation rates of four isolates were 49.4%~54.9% (yellow feather), and 75.5%~80.3% (white feather), respectively. The pH values in culture solution were increased from 7.2 to 8.2 - 8.9.

Key word： Feather, Keratinase, Degradation rate

---

1. Research assistant, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
2. Researcher, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
3. Corresponding author. E-mail: lcc@tactri.gov.tw

蔬菜與加工產品中食媒性病原菌調查

陳曉萱[1] 陳淑娟[1] 林良怡[1] 羅致逑[2,3]

中文摘要

隨機調查71件農場與加工產品中病原菌之情形。樣品包括農場生鮮蔬菜與超市生鮮蔬菜，超市加工產品，連鎖速食店與超商。有23件(31.9%)大腸桿菌群量大於10^3 MPN g^{-1}，11件(15.**2**%)大腸桿菌量大於10 MPN g^{-1}。沙門氏桿菌抽檢18件，均為陰性。罐裝醃漬品皆無大腸桿菌群，大腸桿菌，沙門氏桿菌之檢出。有1件盒裝醃漬品有大腸桿菌檢出。

關鍵詞：大腸桿菌群，大腸桿菌，沙門氏桿菌。

前言

有機肥料、農地、灌溉水及生食蔬菜在國內外均曾被檢出有病原菌。例如*Salmonella* spp.，*E. coli* O157:H7，及*Listeria* spp.。而這些致病菌在這些環境中可存活一段很長的時間，並造成人類的死亡。2011年4月德國發生的芽菜含O104:H4型大腸桿菌事件(WHO,2011)，台灣自民國70年至102年國內細菌性食因性中毒事件共2579件，其中蔬菜為88件。因此從源頭農地開始管控，確保產品安全是很必要的。Islam等人(Islam,2004)將萵苣(Lettuce)與香菜(Parsley)種植在含有E. coli O157:H7菌之家禽糞堆肥(Poultry manure compost)，乳牛糞堆肥(Dairy manure compost)之土壤中，發現病菌可存活在土中154~217天，在萵苣上可存活77天，在香菜上可存活177天。沙門氏菌可在牛糞肥(Bovine manure)中可存活3~5星期，在濕土中45天(Guo,2002)。台灣目前有機農戶約有3317戶，有機農產品業者約有1621家。因此本研究室針對農場及超商超市的生食性蔬果，進行人畜共通致病菌檢驗。

---

1. 農業藥物毒物試驗所研究助理

2. 農業藥物毒物試驗所研究員

3. 通訊作者. E-mail: lcc@tactri.gov.tw

材料與方法

1、 樣品來源

超市：生食性蔬菜。

超商、速食店：蔬菜沙拉。

農產加工品：果醬、泡菜、梅漬物等。

2、 採樣方法

農地之樣品，低溫運送回實驗室檢驗。如為沙拉樣品與生鮮蔬菜則為當日上午採樣，立即分析。蔬菜樣品分清洗與未清洗，清洗方式為在無菌操作台中，以燒杯裝二次去離子水，將樣品置入燒杯中，以超音波方式清洗 30 秒，以滅菌鑷子取出進行分析。

3、 病原菌之檢驗與確效

檢驗大腸桿菌群、大腸桿菌、沙門氏菌等3種項目。

(1) 大腸桿菌群之檢驗：依食管署公告方法進行(部授食字第1021950329 號， MPN法)(衛生福利部食品藥物管理署，2013)。

(2) 大腸桿菌之檢驗：依食管署公告方法進行(部授食字第1021951163 號 ，MPN法) (衛生福利部食品藥物管理署，2013)。

(3) 沙門氏菌之檢驗：參考食管署方法修正進行(部授食字第1021951187號) (衛生福利部食品藥物管理署，2013)。

結果與討論

71件樣品包括農場生鮮蔬菜與超市生鮮蔬菜30件，超市加工產品18件，連鎖速食店與超商生菜沙拉23件。其中有23件(31.9%)大腸桿菌群超過衛生署的衛生標準(10^3 MPN g^{-1})，11件(15.2%)大腸桿菌超過衛生標準(10 MPN g^{-1})，沙門氏桿菌抽檢18件，均為陰性。現分述如下：

1. 農場生鮮蔬菜與超市生鮮蔬菜

30件生鮮蔬菜分別來自傳統農場和有機農場及超市。

10件傳統農場生鮮蔬菜樣品中，有6件(60%)大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，3件(30%)大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}，無沙門氏桿菌檢出(0%)(表1)。青蔥2件樣品中大腸桿菌群均大

於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。豆芽3件中有2件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，2件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。空心菜1件中大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}。白菜1件中大腸桿菌群大於10 MPN g^{-1}。

20件有機農場生鮮蔬菜樣品中，有10件(50%)大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，5件(25%)大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}，無沙門氏桿菌檢出(0%)(表1)。小黃瓜5件中有2件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}。苦瓜5件中有1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。青蔥3件中有2件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，2件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。豆芽3件中有2件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，2件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。空心菜1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}。胡蘿蔔1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，且大腸桿菌也大於10 MPN g^{-1}。萵苣1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，大腸桿菌也大於10 MPN g^{-1}(表1)。

比較生鮮蔬菜樣品帶土與不帶土之差異，發現5件帶土之小黃瓜和苦瓜中，有3件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}，顯示帶土的蔬菜較易有大腸桿菌群和大腸桿菌之汙染(表1)。

比較水洗與不水洗生對鮮蔬菜樣品之去菌效果，未經清洗的蔬菜樣品有5件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，2件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}(表1)，經清洗後，有4件大腸桿菌群仍大於10^3 MPN g^{-1}，2件大腸桿菌仍大於10 MPN g^{-1}。顯示原已受到病菌汙染的蔬菜，清洗處理後效果有限(表1)。可能的原因為菌落已著生於蔬菜的表面而不易清除。Dong等人(2003)研究亦指出Salmonella細菌可在苜蓿(Alfalfa)之初芽內層形成菌落，而此內層菌落可能是土中致病菌經側根侵入。

2. 超市農業加工產品

18件農產加工品為來自3家超市中，僅1件產品檢驗出大腸桿菌群與大腸桿菌(表2)，但皆未超過衛生署訂定之衛生標準(大腸桿菌群應小於10^3 MPN g^{-1}，大腸桿菌應小於10 MPN g^{-1})。

來自超市中4瓶果醬皆無大腸桿菌群和大腸桿菌之檢出(表2)。來自超商超市5瓶罐裝醃漬品也均無大腸桿菌群和大腸桿菌(表2)。自超商超市中檢驗之市售4件盒裝，2件開放式及1件密封袋裝醃漬品，顯示亦無大腸桿菌群和大腸桿菌(表2)。

調查結果顯示抽檢之農產加工產品可能因有高鹽度或高糖量醃漬，加上良好的密封包裝保存，造成大腸桿菌群和大腸桿菌較不易汙染與存活。

3. 連鎖速食店與超商生菜沙拉

連鎖速食店與超商隨機抽檢23件生菜沙拉，其中7件(30.4%)大腸桿菌群超過衛生署的衛生標準(10^3 MPN g^{-1})，3件(13%)大腸桿菌超標(10 MPN g^{-1})(表3)。

生菜沙拉7件樣品中，有3件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。苜蓿芽2件產品中，有1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}。碗豆嬰6件產品中，有2件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。香菜1件產品中，有1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10^3 MPN g^{-1}。顯示生食性蔬菜比水果易檢出大腸桿菌群和大腸桿菌(表3)。本項工作目前持續執行中。

超商SM01之2件產品和超商SM06之1件產品中皆檢出含大腸桿菌群，但量低於10^3 MPN g^{-1}，大腸桿菌量未檢出。超商SM02之2件產品中，2件大腸桿菌群均大於10^3 MPN g^{-1}。超商SM03之12件產品中，有4件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。超商SM04之5件產品中，有1件大腸桿菌群大於10^3 MPN g^{-1}，1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。超商SM05之1件產品中有1件大腸桿菌大於10 MPN g^{-1}。SM01和SM06均未檢出大腸桿菌，大腸桿菌群有檢出，但均低於10^3 MPN g^{-1}。SM02抽檢之兩個樣品則皆超過衛生標準(大腸桿菌群應小於10^3 MPN g^{-1}，大腸桿菌應小於10 MPN g^{-1})。食用時應注意。

結論

本次共分析71件生食蔬菜，其中有半數樣品檢出大腸桿菌群與大腸桿菌。生菜沙拉之大腸桿菌偏高。罐裝醃漬品皆無大腸桿菌群，大腸桿菌與沙門氏桿之檢出。1件盒裝醃漬品有大腸桿菌檢出，但未超過衛生標準。將加強抽檢生菜沙拉和盒裝醃漬品。抽檢之18件所有商品均無沙門氏桿菌。

本研究室將持續調查農與加工產品之病原菌分佈之情形，以提供農民與相關業者農產品中致病菌檢測服務，及提供更農產品，協助農業的永續經營。

引用文獻

Dong, Y., A. L. Iniguez, B. M. Ahmer and E. W. Triplett. 2003. Kinetics and Strain Specificity of Rhizosphere and Endophytic Colonization by Enteric Bacteria on Seedlings of Medicago sativa and Medicago truncatula. *Appl. Environ. Microbiol*. **69**: 1783-1790.

Guo, X., J. Chen, R. E. Brackett and L. R. Beuchat. 2002. Survival of *Salmonella* on tomatoes

stored at high relative humidity in soil, and on tomatoes in contact with soil. J. Food Prot. 65: 274-279

Islam, M., M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004. Persistence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley composts or irrigation water. J. Food Prot. 67: 1365-1370

World Health Organization Regional Office for Europe. Outbreaks of E. coli O104:H4 infection: update 30. 22 July 2011. [Accessed 29 July 2011]. Available at: http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30

表1. 農場中蔬菜之致病菌檢驗結果。

Table1. Pathogens detected in fresh vegetables from farms.

Sample	Coliform group (MPN g^{-1})	*E. coli* (MPN g^{-1})	*Salmonella* sp.
Cucumber			
Traditional cucumber	3.2	ND[z]	ND
Traditional cucumber (wash)	ND	ND	ND
Organic cucumber	ND	ND	ND
Organic cucumber with soils	$> 1.0 \times 10^3$	5.3	ND
Organic cucumber with soils (wash)	$> 1.0 \times 10^3$	ND	ND
Organic cucumber	ND	ND	ND
Organic cucumber with soils	2.1×10^2	ND	ND
Bitter squash			
Organic bitter squash	2.3×10^1	ND	ND
Organic bitter squash	3.6	ND	ND
Organic bitter squash with soils	$> 1.1 \times 10^3$	1.75×10^2	ND
Organic bitter squash	4	ND	ND
Organic bitter squash with soils	8	ND	ND
scallions			
Traditional scallions	$>1.1 \times 10^3$	2.1×10^1	ND
Traditional scallions (wash)	4.6×10^3	ND	ND
Organic scallions	$>1.1 \times 10^3$	ND	
Organic scallions	$> 1.1 \times 10^3$	9	ND
Organic scallions (wash)	6.0×10^2	ND	ND
Bean sprouts			
SM03 Traditional mungbean sprouts	ND	ND	
SM03 Traditional mungbean sprouts	＞ 1.1×10^5	＞ 1.1×10^5	
Traditional mungbean sprouts (wash)	＞ 1.1×10^4	＞ 1.1×10^4	
SM04 Traditional mungbean sprouts	＞ 1.1×10^5	3.2×10^1	
Traditional mungbean sprouts (wash)	＞ 1.1×10^4	2.7×10^1	
SM04 Organic soya bean sprouts	ND	ND	
Rape			
Traditional rape	1.5×10^2	ND	

Organic rape	2.4×10^2	ND	
Water spinach			
Traditional water spinach	$>1.1 \times 10^3$	ND	
Organic water spinach	1.1×10^3	3.0	
Cabbage			
Traditional cabbage	$>1.1 \times 10^3$	ND	
Organic carrot	$> 1.1 \times 10^3$	1.3×10^1	ND
Organic lettuce	$> 1.1 \times 10^3$	3.5×10^2	ND

ND^z: non-detectable, coliform < 0.3 MPN g^{-1}, *E. coli* < 0.3 MPN g^{-1}

表 2. 超市中農產加工品之致病菌檢驗結果。

Table2. Pathogens detected in agricultural processed products from supermarkets.

Sample	Coliform group (MPN g^{-1})	*E. coli* (MPN g^{-1})
Strawberry jam	ND^{z}	ND
Marmalade jam	ND	ND
Grape jam	ND	ND
Passion fruit and mango jam	ND	ND
Pitted prunes	ND	ND
Tender ginger with sweet and sour sauce	ND	ND
Preserved pineapple	ND	ND
Gold seaweed salad	ND	ND
Sliced radish with sauce	ND	ND
Vegetable kimchi	ND	ND
Korean kimchi	ND	ND
Gold kimchi	ND	ND
Gold kimchi-vegetable	ND	ND
Gold kimchi-vegetable	ND	ND
Kimchi- chinese cabbages (light spicy)	3.5×10^{1}	9.3
Kimchi-cabbage(heavy spicy)	ND	ND
Sesame burdock	ND	ND
Sesame burdock	ND	ND

ND^{z}: non-detectable, coliform < 0.3 MPN g^{-1}, *E. coli* < 0.3 MPN g^{-1}

表 3. 便利超商、超市與連鎖速食店中生菜沙拉之致病菌檢驗結果。

Table3. Pathogens detected in vegetable salads from convenience stores, supermarkets and fast-food chain restaurants.

Sample	Coliform group (MPN g^{-1})	*E. coli* (MPN g^{-1})
SM01 Caesar salad	23	ND[z]
SM01 Fresh vegetable	6.1	ND
SM02 Fresh colorful salad	> 1100[a]	ND
SM02 Rich fiber salad	2.8×10^3	ND
SM03 Vegetable salad	> 1100	ND
SM03 Strawberry	ND	ND
SM03 Strawberry (wash)	ND	ND
SM03 Tomato	ND	ND
SM03 Purple cabbage	1.7×10^1	ND
SM03 Lettuce	6.6×10^1	4.8
SM03 Romaine lettuce	1.8×10^1	ND
SM03 Alfalfa	$> 1.1 \times 10^3$	1.2
SM03 Organic pea sprouts	8.9×10^4	39
SM03 Organic pea sprouts (wash)	3.3×10^3	2.4
SM03 Organic pea sprouts	ND	ND
SM03 Coriander	ND	ND
SM04 Organic pea sprouts	7.6	ND
SM04 Organic pea sprouts (wash)	ND	ND
SM04 Organic pea sprouts	ND	ND
SM04 Organic alfalfa	ND	ND
SM04 Coriander	＞ 1.1×10^5	44
SM05 Seasons salad	7×10^1	2×10^1
SM06 Fresh vegetable salad	1×10^2	ND

ND[z]: non-detectable, coliform < 0.3 MPN g^{-1}, *E. coli* < 0.3 MPN g^{-1}

Food-borne Pathogens Survey in Selected Vegetables and Processed Products

Hsiao-Hsuan Chen[1], Shu-Chuan Chen[1], Liang-Yi Lin[1], and Chi-Chu Lo[2,3]

Abstract

Total 71 samples of fresh vegetables and commercial processed products randomly selected from farms and markets were analyzed. The results showed that 23 samples contaminated with coliform, and the concentrations were larger than 1000 MPN g^{-1}, 11 samples contaminated with *E. coli* and the concentrations were larger than 10 MPN g^{-1}. No *Salmonella* spp. were detected. Coliform, *E. coli*, and *Salmonella* spp. were also not detected in canned products. Coliform was detected in one kimchi products packed in plastic box.

Key Words：Coliform, *E. coli*, *Salmonella* spp.

---

1. Research assistant, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
2. Researcher, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
3. Corresponding author. E-mail: lcc@tactri.gov.tw

菌根菌應用技術對高屏地區芒果生育之研究

張耀聰 [1,2]

摘要

本研究目的在瞭解高屏地區愛文芒果，利用叢枝菌根菌接種進行草生栽培，其土壤肥力及植體營養變化情形。並藉由土壤採樣，瞭解叢枝菌根菌之族群密度與種類，及對芒果生育之影響。由試驗結果指出，愛文芒果在不同敷蓋情況下，在土壤肥力方面，草生栽培比起非草生栽培可有利於土壤有機質之提升。在植體營養方面，6種草種接種3種叢枝菌根菌，均可形成菌根結合，且有助於提高芒果葉片P之養分濃度。而在芒果果園土壤菌根菌相調查方面，草生栽培之菌根菌相，其種類與數量均較多於非草生栽培之田區。而具有叢枝菌根菌之草生栽培情況下，能促進芒果果長及果重生長。

關鍵詞：叢枝菌根菌、芒果、肥培管理、草生栽培

前言

芒果（檬果）(*Mangifera indica* L.)，屬於漆樹科(Anacardiaceae)芒果屬(*Mangifera*)是由英文 Mango 音譯而來。原產於印度，栽培至少四千年，為熱帶果樹。台灣於 1561 年（明朝嘉靖 40 年）荷蘭人引進。目前主要栽培品種以柴樣（土芒果或在來種)、金煌，及美國種愛文、海頓、凱特（43 年引進）等為主。台灣目前（103 年農糧署統計）栽培種植面積約 15,068 公頃，主要在台南（7,032 公頃）及高屏地區（7,090 公頃）即占全台約 93.7%，產量更高達 142,661 公噸，而高屏地區芒果產值可達新台幣約 44.71 億元。但在台灣耕地土壤中，農民普遍大量使用過磷酸鈣補充磷肥，但土壤中磷常會因土壤 pH 之變化與鐵、鋁及鈣等結合，形成無機態之難溶性鹽類，而無法有效供植物利用。叢枝菌根菌為微生物肥料菌種之一，作物與其接種共生形成菌根後，菌根根尖分泌之溶解酵素，則可對土壤中不易溶解之磷酸鈣、磷酸鐵及磷酸鋁進行解離，並促進植物吸收。但其應用最佳接種效果為育苗階段進行，在已定植之多年生果樹中進行接種，易產生事倍功半之效果。但如能利用草種接種菌根菌，以此載體進行草生栽培，如此應能增進作物接種機會，並使土壤有效性磷得以提升，亦能減少雨水逕流沖刷土壤。高屏地區芒果栽種多數定植於坡地酸性或強酸性土壤，而土壤 pH 低之情況

1.通訊作者

2.高雄區農業改良場助理研究員

下會造成土壤磷肥有效性降低，然而經研究指出，芒果屬於絕對菌根植物（吳與林，1998），顯示該植物對菌根之依存度相當高，因此藉由此研究將草本植物接種菌根菌導入芒果果園，藉由其根尖分泌之溶解酵素，提升溶磷肥有效性，將可提升磷肥效率，並可兼顧水土保持，因此，本研究於高屏地區芒果果園田間進行叢枝菌根菌接種草種，並定植於芒果根圈周圍，以瞭解其對土壤肥力變化情形及作物生育之影響，以利日後相關研究參考及田間應用推廣。

材料與方法

一、研究品種選擇

本研究芒果品種選擇為愛文芒果，高屏地區栽種面積約7,090公頃，佔全台約40%，為目前外銷之主要芒果品種。而試驗地點選擇高屏地區愛文芒果栽種最多的3個鄉鎮進行，芒果植株齡級為7年至20年生以上之愛文植株。

二、試驗地點

本研究選擇屏東縣枋寮鄉（總種植面積708公頃，年產量10612.85公噸）、枋山鄉（種植729公頃，年產量10259.71公噸）及獅子鄉（種植1026公頃，年產量15256.85公噸）愛文芒果田區進行調查，分別為在上述3個地區選擇，枋寮7年生、枋山20年生以上及獅子地區約15年生之愛文芒果園，共7個田區進行採樣試驗，由於此三鄉鎮之芒果為全台愛文芒果產季最早，並為高屏地區栽培面積最大之鄉鎮，因此選擇該地區之芒果果園進行試驗研究。試驗田座標如述：枋寮地區GPS：1. N 22d 21m 27.85s：E 120d 37m 12.97s(處理1：雷公根(*Centella asiatica*）草生），2. N 22d 21m 28.81s：E 120d 37m 13.65s（處理2：非草生）。枋山地區：3. N 22d 14m 56.81s：E 120d 39m 43.74s（處理3：高麗芝（*Zoysia tenuifolia*）草生），4. N 22d 14m 58.90s：E 120d 39m 41.84s（處理4：非草生）。獅子地區：5. N 22d 15m 59.84s：E 120d 40m 45.51s（處理5：草生），6. N 22d 15m 59.99s：120d 40m 45.52s（處理6：非草生）。共6個田區，均為生長管理良好之田區。

三、土壤及植體採樣分析與菌種分離鑑定

1.土壤採樣及分析：

上述6個田區於每季進行田間土壤採樣，並進行土壤肥力分析測定土壤pH、有機質、磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅、鈉及電導度等。

2.植體採樣分析：

每季於土壤採樣之同時，並進行植體採樣，植體採集位置為芒果中位葉，實為頂葉往下計算第7-8片葉子之成熟葉片位子稱為中位葉，每園區採樣20片葉子，必須為外觀可判斷無營養缺乏之葉片，並進行氮、磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅、鈉及硼的養分測定。

3.叢枝菌根菌之分離鑑定與培養：

於上述6個果園土壤進行土樣採集之同時，將採集之表土土壤樣品，利用濕篩法將土壤中叢枝菌根菌孢子分離鑑定，並使用砂耕法加以繁殖培養。

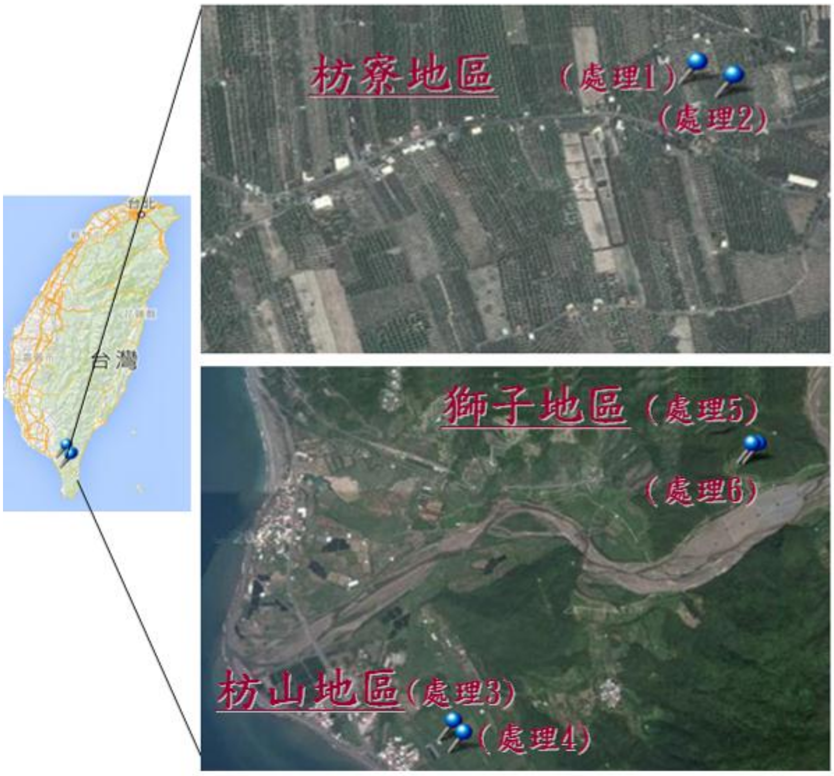


圖1、芒果田間試驗區相對位置圖

四、草種選擇及菌根菌繁殖培養與接種

1.草種選擇：

選擇原果園定植或高屏地區果園常見之草生栽培草種，進行繁殖接種，草種選擇共計6種，分別為雷公根、蔓花生（*Arachis pintoi*）、蠅翼草（*Desmodium triflorum*）、過江藤（*Phyla nodiflora*）、高麗芝及心葉水薄荷（*Clinopodium brownei*）等。將草種以扦插等方式培育，並進行原地區土壤固有並容易大量繁殖之菌種進行接種培育。

2.草種接種培養：

將上述地區原土壤分離之菌種，大量培養之*Claroideoglomus etunicatum* 、*Funneliformis mossea*及*Rhizophagus intraradices*菌根菌孢子，以孢子土接種方式，推估接種量（約100 sport/plant）進行上述草種接種，並確認接種共生後，定植於2年生芒果作物根圈周圍，藉以擴大根圈叢枝菌根菌族群數量，並藉此觀察芒果植體養分變化情形，以瞭解草生栽培接種菌根菌對植體營養之影響。

五、果實品質調查

調查比較不同月份間之果實長度、寬度、可溶性固形物（total soluble solids；^{o}Brix）（糖度）及單果重等。

結果與討論

一、愛文芒果每季土壤肥力變化情形

愛文芒果果園，枋寮及枋山地區每季土壤採樣，共 6 個樣點表、底土分析，採樣季節分為 7、10、1、4 月，其分析結果如表 1、表 2 及表 3 所示。

表 1.枋寮地區愛文芒果果園每季土壤肥力變化

處理		pH	O.M	P_1	K_{ex}	Ca_{ex}	Mg_{ex}	Fe_{ex}	Mn_{ex}	Cu_{ex}	Zn_{ex}	Na_{ex}	E.C
		(1：1：w/v)	%	-----------------mg kg^{-1}-------------------									(1:5;dS/m)
2014/July													
1	表土	5.55	3.06	187	87	1284	146	372	11	4.9	5.4	25	0.04
1	底土	5.41	2.55	199	54	867	124	405	13	4.6	4.1	18	0.03
2	表土	4.34	2.52	122	71	292	85	833	2.7	3.0	2.1	37	0.09
2	底土	4.37	2.21	164	77	227	68	486	3.1	2.6	1.9	23	0.08
2014/October													
1	表土	5.25	2.29	164	191	929	117	580	13	5.2	6	27	0.08
1	底土	5.01	2.30	180	171	1059	97	533	12	4.4	5.6	19	0.06
2	表土	4.62	2.07	161	63	334	82	309	44	5.5	9.5	63	0.03
2	底土	4.63	2.10	149	61	270	82	537	74	3.3	13	17	0.03
2015/January													
1	表土	6.97	2.29	157	115	1801	244	294	24	5.0	5.7	20	0.06
1	底土	7.05	2.21	78	102	1470	242	294	16	4.3	3.8	19	0.04
2	表土	6.48	2.16	118	63	1128	185	447	18	5.5	3.9	18	0.04
2	底土	6.54	2.13	75	60	1085	223	318	19	4.2	2.9	15	0.02
2015/April													
1	表土	4.21	2.47	232	131	668	122	725	8	5.3	3.6	20	0.18
1	底土	4.73	2.51	138	127	881	108	673	15	6.3	4.6	19	0.12
2	表土	4.26	2.32	118	79	316	64	1211	4.1	4.3	3.6	17	0.04
2	底土	4.28	2.27	135	74	285	68	907	5.4	3.8	3.2	13	0.03

O.M: organic matter; P_1=Bray No.1; K_{av}=available K; Ca_{ex}, Mg_{ex}, Fe_{ex}, Mn_{ex}, Cu_{ex}, Zn_{ex} and Na_{ex}=HCl extractable

由表 1 可看出，處理 1 及處理 2 在每季土壤有機質變化中，處理 1 為雷公根草生栽培，處理 2 為非草生（地被裸露）栽培之芒果園區，此 2 果園為相同土系，並依相同方式進行肥培管理，但不同地被處理方式，將影響其有機質含量之變化，在草生栽培區域（處理 1），雖以相同肥培管理方式進行，但可明顯看出其表、底土層，有機質含量明顯差異。

表 2.枋山地區愛文芒果果園每季土壤肥力變化

處理		pH (1：1：w/v)	O.M %	P_1	K_{ex}	Ca_{ex}	Mg_{ex}	Fe_{ex}	Mn_{ex}	Cu_{ex}	Zn_{ex}	Na_{ex}	E.C (1:5;dS/m)
				-----------------			mg kg^{-1}				-------------------		
2014/July													
3	表土	6.48	2.20	39	73	617	131	62	20	1.6	4.3	11	0.03
	底土	6.83	1.98	23	70	519	128	46	7.5	0.6	0.9	5.3	0.01
4	表土	6.89	2.11	59	71	1026	161	172	28	13	7.8	17	0.03
	底土	7.0	1.78	26	69	794	142	107	20	2.9	2.5	13	0.03
2014/October													
3	表土	6.35	1.92	150	68	724	98	477	54	2.6	11.0	9.4	0.02
	底土	6.64	1.72	226	72	918	89	371	87	3.7	13.0	85	0.02
4	表土	6.57	1.67	72	73	1175	167	327	152	3.3	1.8	17	0.02
	底土	6.85	1.65	48	67	920	154	564	215	1.5	3.4	41	0.02
2015/January													
3	表土	6.76	2.42	84	59	812	128	74	21	1.6	4.2	11	0.03
	底土	6.94	2.09	67	48	568	115	50	6.3	0.7	0.9	9.3	0.02
4	表土	6.07	1.81	36	90	1378	160	156	39	27	18	21	0.06
	底土	6.38	1.75	34	67	977	144	164	28	11	6.3	14	0.04
2015/April													
3	表土	6.28	1.89	112	63	613	115	99	25	2.0	3.2	12	0.03
	底土	6.51	1.94	58	57	619	115	104	26	1.8	3.3	11	0.03
4	表土	6.42	1.79	58	61	895	143	177	26	7.6	5.4	18	0.04
	底土	6.56	1.72	54	55	697	128	235	31	3.6	3.0	14	0.03

O.M: organic matter; P_1=Bray No.1; K_{av}=available K; Ca_{ex}, Mg_{ex}, Fe_{ex}, Mn_{ex}, Cu_{ex}, Zn_{ex} and Na_{ex}=HCl extractable

表 3.獅子地區愛文芒果果園每季土壤肥力變化

處理		pH (1：1：w/v)	O.M %	P_1	K_{ex}	Ca_{ex}	Mg_{ex}	Fe_{ex}	Mn_{ex}	Cu_{ex}	Zn_{ex}	Na_{ex}	E.C (1:5;dS/m)
				-----------------mg kg^{-1}-------------------									
2014/July													
5	表土	5.42	3.11	119	108	694	155	26	11	1.7	1.8	7.1	0.1
	底土	5.32	2.79	87	90	534	174	20	4.3	0.7	0.5	8.1	0.11
6	表土	6.22	2.72	69	138	816	160	38	15	1.8	2	8.1	0.03
	底土	6.13	2.51	31	139	846	179	52	17	1.8	2.2	9.4	0.03
2014/October													
5	表土	5.46	3.23	84	85	587	159	20	4.9	1.0	0.7	7.4	0.03
	底土	5.22	3.56	79	87	552	167	18	5.7	1.0	0.7	7.7	0.03
6	表土	5.67	2.17	47	128	1251	189	68	34	3.3	3.7	7.4	0.03
	底土	5.63	2.33	53	134	1328	205	57	40	4.4	3.5	9.4	0.05
2015/January													
5	表土	4.82	3.35	127	110	659	145	39	17	2.9	2.3	7.6	0.08
	底土	5.26	3.32	136	83	421	115	23	4.6	1.0	0.7	6	0.04
6	表土	4.89	3.04	84	158	733	103	77	35	2.8	4.9	7.5	0.05
	底土	4.94	2.36	39	153	902	122	62	28	1.8	4.9	4.9	0.04
2015/April													
5	表土	5.08	3.83	153	129	779	130	79	33	3.9	4.7	12	0.03
	底土	5.32	3.19	150	1036	518	115	57	16	2.2	1.9	9	0.02
6	表土	4.47	3.30	121	197	995	115	139	49	2.6	5.9	10	0.12
	底土	4.46	2.45	90	112	535	74	138	45	2.7	5.1	8.5	0.09

O.M: organic matter; P_1=Bray No.1; K_{av}=available K; Ca_{ex}, Mg_{ex}, Fe_{ex}, Mn_{ex}, Cu_{ex}, Zn_{ex} and Na_{ex}=HCl extractable

另外由表 2 及表 3 亦可看出，枋山地區及獅子地區之愛文芒果果園每季之土壤肥力變化差異甚大，相同肥培管理方式（處理 3、處理 4 相同，處理 5、處理 6 相同），但不同之敷蓋方式（處理 3 及處理 5 草生栽培；處理 4 及處理 6 非草生裸地栽培），在土壤有機質含量上，均屬於草生覆蓋有較高之有機質含量，雖在不同鄉鎮區域，但均有相同結果，顯示草生栽培確實可增加表土層之有機質含量。

二、愛文芒果每季中位葉植體養分變化

於每季當中進行植體葉片營養分析，由表 4、表 5 及表 6 可看出不同季節葉片養分濃度之變化。

表 4.枋寮地區愛文芒果果園每季中位葉養分濃度變化

處理	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn	Na	B
	Nutrient concentration										
	-----------%-------------					------------mg kg^{-1}-----------					
	2014/July										
1	2.67	0.13	0.77	3.21	0.13	507	72	6.5	29	816	43
2	2.39	0.12	0.71	3.21	0.12	519	81	5.2	28	677	36
	2014/October										
1	2.33	0.15	1.32	1.00	0.18	226	53	22	19	324	28
2	2.36	0.07	0.6	0.54	0.09	111	13	10	9	104	13
	2015/January										
1	2.08	0.15	0.69	1.07	0.12	113	41	13	19	217	37
2	1.66	0.12	1.02	1.71	0.12	451	72	18	24	359	37
	2015/April										
1	1.67	0.06	0.17	0.66	0.04	75	46	13	14	136	9
2	1.83	0.04	0.33	0.66	0.04	103	49	18	18	218	10
	年平均										
1	2.19	0.16	0.74	1.49	0.12	230	53	13.6	20.3	373	29.3
2	2.06	0.13	0.67	1.53	0.09	296	54	12.8	19.8	340	24.0

由表 4 可明顯發現枋寮地區愛文芒果在年平均葉部養分含量方面，平均各項養分濃度，僅 Ca 的濃度，草生處理顯現稍低於非草生處理，其他的大量元素（N、P、K、Mg）草生處理均高於非草生處理。在微量元素方面，草生處理 Cu、Zn、Na 及 B，則顯現稍高於非草生處理。而在表 5 枋山地區之芒果中位葉養分分析結果，由年平均之部分可發現，在植體大量元素方面， P、Ca、Mg 的濃度，草生處理顯現高於非草生處理，其他的大量元素（N、及 K）草生處理則稍微低於非草生處理。在微量元素方面，草生處理 Mn、Zn 及 B，則顯現稍高於非草生處理。

表 5.枋山地區愛文芒果果園每季中位葉養分濃度變化

處理	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn	Na	B
	Nutrient concentration										
	-----------%-------------					------------mg kg^{-1}-----------					
2014/July											
3	2.60	0.20	1.19	2.29	0.36	97	53	5	41	632	40
4	2.03	0.14	1.16	1.84	0.32	62	58	7.8	23	850	38
2014/October											
3	3.24	0.19	1.18	2.16	0.24	160	46	6.3	32	785	38
4	3.82	0.18	1.31	1.96	0.26	59	73	4.6	24	610	37
2015/January											
3	1.9	0.14	0.97	1.18	0.25	176	69	7.2	141	798	59
4	2.26	0.15	1.14	1.71	0.21	86	86	28.3	60	791	59
2015/April											
3	2.26	0.15	0.74	2.81	0.30	194	70	19	52	710	57
4	2.11	0.13	0.57	1.92	0.18	85	80	47	135	844	30
年平均											
3	2.50	0.17	1.02	2.11	0.29	157	60	9.4	66	731	48.5
4	2.56	0.15	1.05	1.86	0.24	73	74	21.9	61	774	41.0

表 6.獅子地區愛文芒果果園每季中位葉養分濃度變化

處理	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn	Na	B
	Nutrient concentration										
	-----------%-------------					------------mg kg^{-1}-----------					
2014/July											
5	2.33	0.16	1.37	1.69	0.21	248	40	13	25	576	34
6	2.63	0.15	1.1	1.62	0.27	228	56	19	20	508	32
2014/October											
5	3.06	0.19	1.31	1.15	0.36	188	98	13	19	462	22
6	3.47	0.18	1.29	1.23	0.34	183	85	9.5	18	370	21
2015/January											
5	2.42	0.15	0.74	1.23	0.22	169	71	29	17	283	33
6	2.16	0.09	1.06	2.14	0.26	357	85	7.5	39	816	53
2015/April											
5	1.80	0.10	0.62	2.04	0.26	385	75	116	29	712	14
6	1.59	0.10	0.82	1.58	0.24	200	71	62	30	513	15
年平均											
5	2.40	0.16	1.01	1.53	0.26	248	71.0	42.8	22.5	508	25.8
6	2.46	0.13	1.07	1.64	0.28	242	74.3	24.5	26.8	552	30.3

另外在獅子地區之芒果中位葉養分濃度分析方面，由表 6 可知，大量元素年平均之表現，在 P 的養分濃度方面草生處理比非草生處理高，而其他養分（N、K、Ca、Mg）則為非草生處理有較高養分濃度，在微量元素方面，草生處理 Mn、Zn 及 B，則顯現稍高於非草生處理。在微量元素方面，草生處理 Mn 及 Cu，則顯現稍高於非草生處理。但由表 4、表 5 及表 6 中可發現，接種叢枝菌根菌之草生栽培處理者，對於芒果葉部養分濃度 P 部分均高於非草生處理，顯示叢枝菌根菌對於大量元素 P 具有促進吸收之效果。

三、芒果田區土壤菌根菌調查

將每季採樣土壤之表土層風乾後，秤重 10g 進行菌根菌孢子濕篩分離，再將其每季計算之孢子數進行平均，其結果如表 7 所示。

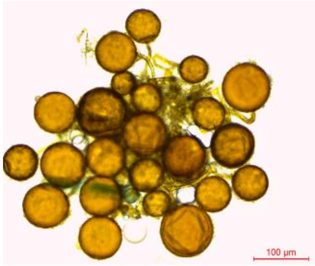
表 7.不同愛文芒果試驗田區表土層之菌根菌族群數量統計（n=4）

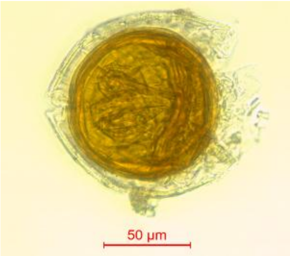
處理		分佈菌種	總孢子數（sports/10g-soil）
枋寮地區	處理 1（草生）	*Diversispora spurca, Glomus minutum, Acaulospora mellea*	126.8±12.4
	處理 2(非草生）	*Acaulospora mellea*	13.3±7.1
枋山地區	處理 3（草生）	*Claroideoglomus etunicatum, Paraglomus occultum*	17.2±7.6
	處理 4(非草生）	*Funneliformis mossea*	4.7±1.6
獅子地區	處理 5（草生）	*Acaulospora mellea, Rhizophagus intraradices, Septoglomus deserticola, Septoglomus constrictum*	28.8±4.7
	處理 6(非草生）	*Acaulospora mellea*	13.6±6.7

此外，將 6 個採樣田區表土土壤，以濕篩法分離出菌根菌孢子並進行鑑定，經 4 個不同季節分離確認之菌種共計 8 屬 9 種(表 7)，而其菌種型態如圖 2 所示。其中 *Acaulospora mellea* 在 4 個不同植被（草生及裸地田區）處理之田區中均有出現，可顯示出該菌種於芒果果園土壤中，出現頻率極高，可能為芒果適生菌種，另由表 7 明顯可以發現，在草生栽培田區中，菌根菌族群數量及種類明顯高於裸地栽培果園，顯示芒果果園地被進行草生栽培，有助於叢枝菌根菌種之族群種類繁殖。

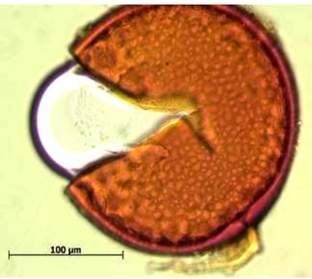
此外將 *Claroideoglomus etunicatum* 、*Funneliformis mossea* 及 *Rhizophagus intraradices* 接種於 6 種草種（雷公根、蔓生花生、蠅翼草、過江藤、高麗芝及心葉水薄荷），其此 6 種草種藉由根系染色觀察，均能發現與叢枝菌根菌形成良好之共生型態（圖 3～圖 8）。

此外，將已接種菌根菌，並感染形成菌根之 6 種草種定植於 2 年生芒果作物根系周圍，並以地被裸露處理作為對照，藉以瞭解草種當作菌根載體，對芒果作物植體營養之影響，由表 8 結果可知，芒果植體養分濃度比較，根域周圍定植接種草種者，大量元素方面 P 顯著高於對照組，此部分結果與表 4、表 5 及表 6 調查結果一致，顯示草種接種菌根菌進行果園草生栽培確實有助於芒果植體養分 P 的吸收。而在微量要素方面則顯示草生栽培 Mn 及 B 高於非草生栽培之對照組，此結果與表 6 有相似情況發生。





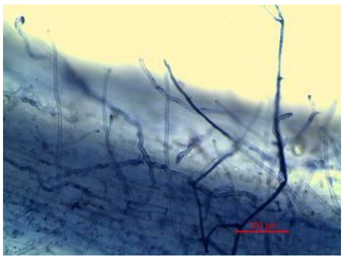
Rhizophagus intraradices ***Acaulospora mellea*** ***Paraglomus occultum***

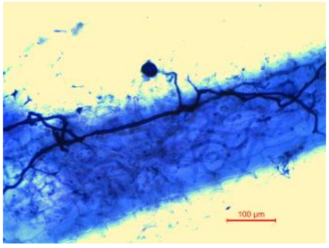


Septoglomus deserticola ***Septoglomus constrictum*** ***Diversispora spurca***

Glomus minutum ***Funneliformis mossea*** ***Claroideoglomus etunicatum***

圖 2. 6 個芒果田區之叢枝菌根菌種外觀型態





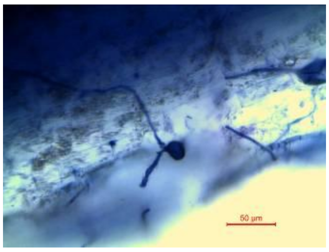


圖 3. 高麗芝接種叢枝菌根菌菌根型態（左 *Rhizophagus intraradices*；中 *Funneliformis mossea*；右 *Claroideoglomus etunicatum*）

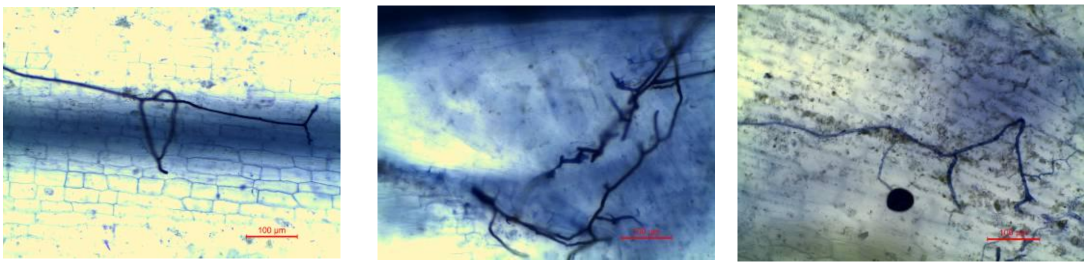


圖4.過江藤接種叢枝菌根菌菌根型態（左*Rhizophagus intraradices*；中*Funneliformis mossea*；右*Claroideoglomus etunicatum*）

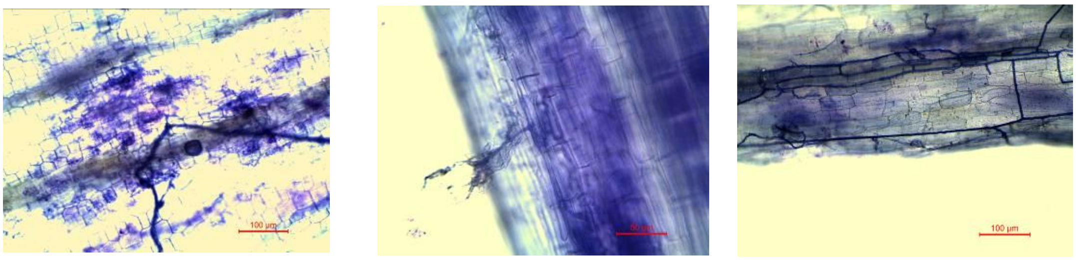


圖5.雷公根接種叢枝菌根菌菌根型態（左*Rhizophagus intraradices*；中*Funneliformis mossea*；右*Claroideoglomus etunicatum*）

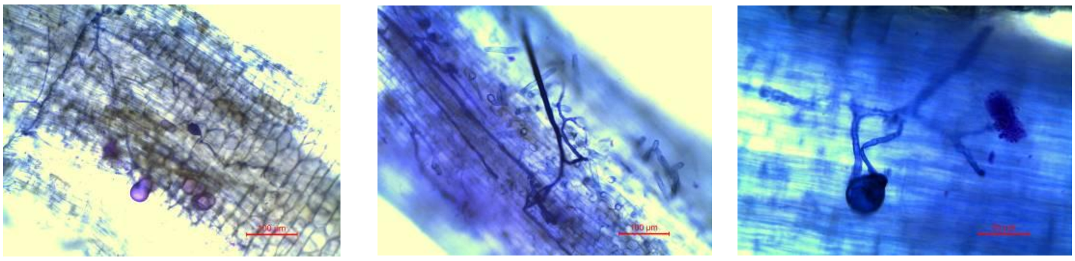


圖6.蔓花生接種叢枝菌根菌菌根型態（左*Rhizophagus intraradices*；中*Funneliformis mossea*；右*Claroideoglomus etunicatum*）

圖7.心葉水薄荷接種叢枝菌根菌菌根型態（左*Rhizophagus intraradices*；中*Funneliformis mossea*；右*Claroideoglomus etunicatum*）

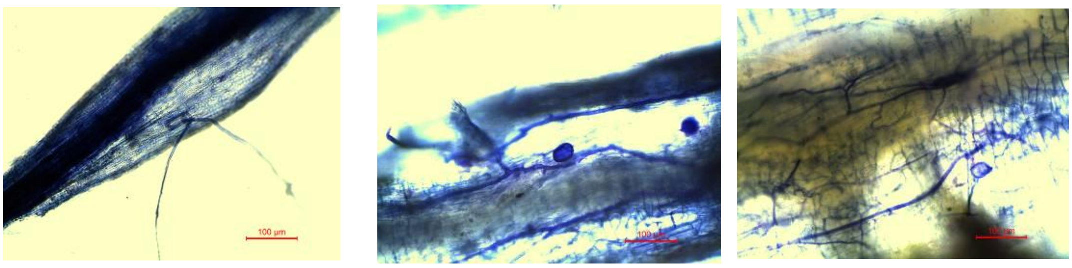


圖8.蠅翼草接種叢枝菌根菌菌根型態（左*Rhizophagus intraradices*；中*Funneliformis mossea*；右*Claroideoglomus etunicatum*）

表 8. 2 年生芒果根域定植接種菌根菌草種對植體養分濃度變化情形

地被草種處理	Nutrient concentration										
	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn	Na	B
	-----------%-------------					------------mg kg^{-1}-----------					
心葉水薄荷	3.31	0.146	0.79	3.26	0.22	94	153	197	25	325	33
雷公根	3.20	0.186	0.90	3.09	0.20	92	174	294	33	355	35
過江藤	2.42	0.134	0.80	2.92	0.22	92	112	212	22	261	33
蔓花生	2.21	0.156	0.80	3.95	0.21	73	147	209	25	265	31
蠅翼草	2.49	0.221	0.98	1.77	0.23	55	127	58	26	176	29
高麗芝	2.32	0.165	0.95	2.53	0.17	54	119	100	26	235	30
對照組	2.40	0.082	0.98	1.83	0.20	37	122	121	33	198	24

四、芒果果實品質調查

不同地區及處理之芒果果園，經果實採收後進行果實品質調查，其結果如表 9 所示。由表 9 之結果可了解，3 個地區草生栽培之果實品質，在果長及果重之表現方面，草生栽培處理者，均有較佳之表現。而在可溶性固形物方面，枋山地區及枋寮地區草生栽培處理，亦顯現出有較高之 ^{o}Brix 表現。由此結果可證明，草種接種叢枝菌根菌，定植於芒果根域周圍，確實可提高作物產量。

表 9.不同地區及處理芒果果實品質變化（數值為 12 重複平均值）

處理	Fruit quality±SD			
	Fruit length（cm）	Fruit width（cm）	Fruit wt.（g）	Total soluble solids (°Brix)
			枋寮地區	
1	10.8±0.7	8.0±0.6	336.8±47.3	17.4±2.7
2	10.7±0.5	7.9±0.3	308.3±34.3	16.4±3.2
			枋山地區	
3	10.8±0.8	8.4±0.5	360.9±62.3	15.8±2.0
4	10.6±0.8	7.9±0.6	283.1±68.8	12.9±1.8
			獅子地區	
5	11.0±0.4	8.2±0.2	372.5±16.5	11.4±1.8
6	10.9±0.9	8.3±0.5	358.9±62.9	12.1±0.3

結論

由本試驗結果可知，研究區域之土壤肥力變化情形，愛文芒果在草生栽培及地被裸露情況下，草生栽培處理在土壤肥力方面，可有利於土壤有機質之提升。此外，在植體營養方面，接種叢枝菌根菌草生栽培，可有助於提高葉片P之養分濃度。在芒果果園土壤菌根菌相調查方面，草生栽培之菌根菌相，其菌種種類及孢子數量均較多於非草生栽培之田區。並且具有菌根菌之草生栽培條件下，能促進作芒果果長及果重生長。

參考文獻

1. 弓明欽、陳應龍、仲崇祿 1997 菌根研究之應用。中國林業出版社。北京。pp.223。
2. 行政院農業委員會農糧署 2015 103年農業統計年報。台北。台灣。
3. 江介倫、黃國禎、邱宏彬、黃 瑩 2009 台灣常用覆蓋草類覆蓋率之研究。農業工程學報 55（4）：90-99。
4. 吳繼光、林素禎 1998 囊叢枝內生菌根菌應用技術手冊。台灣省農業試驗所印行。pp.232。
5. 胡弘道 1990 林木菌根。國立編譯館主編。台北。pp.666。
6. 張汶肇、吳建銘、吳昭慧 2010 果園草生栽培管理。台南區農業改良場技術專刊99-3（NO.149）。
7. 張淑賢 1981 本省現行植物分析與作物需肥診斷技術。P.53-59. 台灣省農業試驗所特刊13號。
8. 張淑賢、黃維廷、連深、吳婉麗 1992 土壤及葉片分析營養診斷應用於柑桔園栽培管理之

研究。土壤肥料試驗報告。P.167-192. 台灣省政府農林廳編印。
9. 陳如茵、許仁宏、林深林、李國權 1984 土壤反應對愛文檬果葉片養分濃度的影響。興大園藝9：23-28。
10. 楊秀珠、吳育朗、黃裕銘、鄭慶生 1999 芒果綜合管理。台灣省農業藥物毒物試驗所編印。P248。
11. Bould, C. and R. I. Parfitt. 1973. Leaf analysis as a guide to the nutrition of fruit crops. X. Magnesium and phosphorus sand culture expriments with apple. J. Sci. Fd. Agri. 24: 175-185.
12. Chetri, K., D. Sanyal and P. L. Kar. 1999. Changes in nutrient element composition of guava leaves in Relation to season, cultivar, direction of shoot,and zone of leaf sampling, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 30:121-128.
13. Kim, H. 1985. Leaf diagnosis for horticultural fertilizer management in Korea. FFTC ext. bulletin No.230.
14. Li, Y. and R. Hao. 1993. The establishment of leaf analysis standard of black currant (Ribes nigrum L.) in northeast China. Acta Horticulturae 352: 259-265.
15. Singh, N.P. and C.B. Rajput 1978. Effect of leaf age and position and fruiting status on guava leaf mineral composition. J. Hort. Sci. 53: 73-74.
16. Tserling, U.V. 1969. Diagnosis of plant nutrition by plantchemical analysis. In： Agrochemical Method in Study of Soil. INSDOC 709-769.
17. Choudhary, M., Bailey, L.D., Grant, C.A. and Leisle, D. 1995 Effect of Zn on the concentration of Cd and Zn in plant tissue of two durum wheat lines. Can. J. Plant Sci. 75: 445－448
18. Daniels, B. A and H.D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of progagules from soil. In “Methods and Principles of mycorrhizal research”. pp.20-45.N.C.Schenck(ed.). The American Phytopathological Society. St. Paul.
19. Jeng, A.S. and Bergseth, H. 1992 Chemical and mineralogical properties of Norwegian alum shale soils, with special emphasis on heavy metal content and availability. Soil Plant Sci. 42: 88－93.
20. Kader, A. A. 1986. biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. Food Technol. 40(5):99-100,102-104.
21. Oliveira, R., S. M. Vosátka, J. C. Dodd and P. M. L. Castro 2005 Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. Mycorrhiza (2005) 16(1): 23–31.

The Study on the Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation on the Growth of the Mango in the Kao-Ping Areas

Yao-Tsung Chang[12]

Abstract

This study aimed at understanding the Kao-Ping area Irwin mango field, the use of arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation grass cultivation on soil fertility and plant nutritional changes situation. Furthermore, the use of soil sampling, understand arbuscular mycorrhizal fungi species, population density and impact on growth and development of the mango. Indicated by the experimental results, the Irwin mango in different mulching treatment, it arbuscular mycorrhizal fungi than non-grass planting grass cultivation in soil fertility, soil organic matter may have to enhance the beneficial. In addition, plant nutrition, the six grass inoculated three kinds of arbuscular mycorrhizal fungi, they can form mycorrhizal structures, and to increase the nutrient concentration leaf phosphorus. In the mango orchard soil arbuscular mycorrhizal fungi phase investigation, in grass cultivation of mycorrhizal fungi compared with the types and quantity than non-grass cultivation.The grass cultivation of having arbuscular mycorrhizal fungi, which can enhance the mango fruit length and fruit weight growth.

Key words: Mycorrhizal fungi, Mango, fertilization, grass cultivation

---

1. Corresponding author.
2. Assistant Researcher, Researcher of Kaohsiung DARES, COA.

菌根菌應用技術—台南地區文旦柚應用研究

黃瑞彰 [1,2]

摘要

本試驗瞭解接種菌根菌對文旦柚感染及苗期生育健化情形，同時評估其耐浸水逆境能力，以穩定文旦產業之永續發展。進行菌根文旦柚育苗，包括 *Glmous mossae* 等 4 菌種，未接菌(NM)為對照，共 5 處理。進行菌根文旦柚育苗，文旦苗接種菌根菌有較佳生長勢，定植後每月量測株高，以接種 *Glomus etunicatum* 表現最佳。文旦柚苗進行浸水逆境試驗，結果顯示無論浸水與否，接種 *Glmous mosseae* 處理有較佳生長勢，且營養含量較未接菌者高。另於 3 個不同地區文旦果園採取土壤樣品，進行菌根菌孢子分離，調查結果顯示每公克土孢子量介於 0.3~2.1 spores ，表土菌根孢子數高於底土，且以有草生栽培最高，菌種經鑑定為 *Glomus intraradices*;*Glomus etunicatum*;*Acaulospora morrowiae* 等 3 種。在叢枝菌根菌接種源繁殖技術之研究，利用不同介質與宿主繁殖叢枝菌根菌，進行產孢量調查，資料顯示以玉米與百喜草產孢量較高，達 165 spores/g。

關鍵詞：生物性肥料、文旦柚、內生菌根菌、浸水逆境

前言

麻豆文旦（Citrus grandis Osbeck cv. Matou Wentan）或稱文旦柚屬芸香科（Rutaceae）柑橘屬植物，由於品質優良、產量高及氣候風土適宜，種植面積逐年增加，成為重要的經濟果樹之一。目前全台種植面積約 4,253 公頃（103 年農業統計年報），年產量 65,974 公噸，主要栽培縣市集中在花蓮縣(1,140 公頃）、台南市（945 公頃）、苗栗縣（488 公頃）、新北市(465 公頃）、宜蘭縣（232 公頃）、雲林縣（230 公頃）及嘉義縣（174 公頃）等地。雲嘉南地區面積近 1,357 公頃，佔 32%，年產量 29,115 公噸，為國內栽培歷史最久及重要產區。

麻豆文旦品質好壞影響價格甚鉅，果園栽培管理及合理化施肥措施為影響之關鍵。柚樹葉片大，蒸散量也大，生育期間土壤水分供應的多寡，對植株生育、產量及品質的影響很大。果園供水不均，植株根群吸收受阻，影響養分吸收，造成樹勢生長不佳，因此，果園應設置灌溉系統，適時、適期供水，以利根群生長及營養元素吸收及運移。針對地下水位高者或排

---

1. 通訊作者

2. 行政院農委會臺南區農業改良場 副研究員

水不佳之果園，加強地上及地下之排水改善，避免因連續下雨積水或土壤飽和造成對根群生育之傷害（根部腐爛）。

麻豆文旦即將歡喜採收時，卻遭逢強風、暴雨，不單造成落果影響產量，植株淹水過久後根系受損，造成樹勢衰弱，甚至死亡。浸水或排水不良造成生產阻害之原因主要為影響作物根系之有氧呼吸作用，阻害根系代謝作用，及養分、水分之吸收。根系缺氧呼吸，而碳代謝循環產生乙醇或有機酸，對作物產量嚴重影響。根系缺氧，而影響植物生長素之合成。土壤中厭氣微生物之代謝醇、醛、酸等有害物質，生長抑制氣體對植物根系產生毒害。

自然界中存在豐富之微生物資源，常將此種資源，利用在農作物生產，如將有益微生物接種在種子或施用在幼苗、土壤上，可增加植物營養要素之供應、提高土壤中養分之有效性、增進根系之生長與養分之吸收、保護根系及增進抗逆境能力等，均可稱之為「微生物肥料」應用（楊，1990；古和黃，1994）。台灣地區高經濟果樹如木瓜、鳳梨與蓮霧及蔬果作物如胡瓜、苦瓜、西瓜、洋香瓜、番茄與甜椒等，均為高磷肥需求之作物，一般農民栽植慣用大量的化學肥料，磷肥大部分因被土壤固定結合或流失，不但栽培成本提高，亦可能造成地下水污染，若能利用菌根菌及溶磷菌等微生物肥料，可促進幼苗與植株之生長，提高移植成活率，減少肥料用量，增進作物之產量品質，達到合理化施肥之目標（黃等,2009）。

叢枝菌根菌(arbuscular mycorrhizal fugi, A M F) 屬於接合菌綱(Zygomycetes)、繡球菌目(Glomales)，是一種存在土壤中能與 90%陸地植物根部形成共生關係的有益真菌（Smith and Read，1997）。叢枝菌根菌能促進作物生長與增加產量，可視為是一種生物性肥料（Azcon a n d El-Atrash，1997；黃等，2010，2011），尤其在一些逆境環境下菌根效果更為明顯（Al-karaki，2001；Nzanza *et al.*,，2012）。因此相較於一般減少環境壓力對作物生產的方法，為植物接種叢枝菌根菌似乎不失為另一較為便捷可行的自然方式。叢枝菌根菌是一類絕對共生菌（obligately symbiotic fungi），要真正大量應用，必須先有適合之菌種與充足的接種源，並將接種工作導入正常的栽培生產程序中，其接種操作必須簡單，感染效率要高，且增產效果顯著，才能有足夠經濟效益（鄔，2003）。自 1951 年代 Barbara Mossee 於英國開始倡導果樹的菌根研究以來，學者們即不斷探討利用菌根菌於農業生產上之可行性。許多報告亦指出接種菌根菌可促進文旦柚或柑桔生長(張，1992；程等，1997；王，2000；王，2007；林等，2000)。程等（1997）亦指出柑橘應屬於兼性菌根植物，土壤肥力高低影響菌根菌促進作物生長之效果。一般距地表 0~15 公分之根系菌根形成率較高超過 15 公分深度之根系，菌根形成率較低。另，張(2009)研究指出番荔枝接種菌根菌可促進生長與增加產量，配合有機質肥料施用效果更為顯著。

鑑於叢枝內生菌根菌與大多作物有良好之親和性，易感染形成囊叢枝內生菌根，產生有益效應。因此，本計畫擬探討接種菌根菌對文旦柚生育影響評估，達到健康台灣，優質農業的目標。

材料與方法

接種叢枝菌根菌對文旦柚生育之影響

1. 菌根文旦柚苗感染與生育之影響

取文旦柚種子(品種：Matou Wentan)，播種於塑膠方形盆(長 30 cm、寬 15cm、高 8 cm)中，每盆 30 棵。育苗介質為細椰纖與蛭石。叢枝菌種為 *Glomus mossae*等 4 菌種，不接種為對照組（NM）。每穴處理接種量為 2g 孢子土（100 spores/g），混合於介質，播種十天後以1,000倍花寶四號(N-P_2O5-K_2O=溶液施肥，每週一次，經育苗 8 週後逢機取 5 株，根洗淨以 2.5% （w/v）KOH 軟化，剪成 4 cm 長，再以 0.05 % 酸性品紅（fuchsin）進行透明染色，以確保為叢枝菌根苗。染色後再以格子線法求其感染率（Bierman and Linderman 1981）。

2. 叢枝菌根菌對文旦柚生育之影響

取文旦柚菌根苗與不接種為對照組（NM），定植於 18 L 塑膠盆，介質為砂質壤土，施肥量按作物施肥手冊施用(N-P2O5-K2O=75-75-75；公克/株/年)，每處理 4 重複，定植 1 個月後，每個月固定調查植株之株高，8個月後進行葉片養分含量分析。

文旦柚穴植盤菌根苗在浸水逆境下之影響

將文旦柚穴植盤菌根苗定植於 5 吋盆中，栽培介質為砂質壤土，定植後 2週後進行水分處理。水分處理分為每日正常給水與浸水組（分別浸水 1~7 天）。以土壤張力計(AquaProbe)將正常給水組土壤維持在 -0.03 MPa，浸水組為(水/土壤＝2/1(v/w))水分狀況。每個處理 5 重複，定植 3 週後調查浸水影響，12週後測定其株高、地上部與地下部鮮、乾重及植體分析。所有盆栽均置於台南區農業改良場玻璃溫室內。

文旦果園菌根菌分離與繁殖

1. 文旦果園菌根菌分離、鑑定與繁殖

於轄區麻豆與斗六地區之文旦果園進行採集，採取表土(0~20 cm)與底土(20~40 cm)根圈附近土壤，進行土壤特性分析，並採取根圈附近土壤，取 10 g 土壤，以 40% 糖液離心後，計數孢子數，而篩選菌種以凹玻璃集中菌種，可在鏡檢之篩選及定量上，達到省工之效果；在型態分類方面，利用Melzer`s Reagent及Polyvinyl-Lacto-Glycerol進行染色及永久玻片製作，利於孢子細胞壁層及表面型態觀察，作為菌種型態鑑定之依據。將採集到之菌根菌孢子進行繁殖，繁殖法採盆缽法，介質為河砂，宿主則為百喜草與玉米，每個5 吋盆塑膠盆（直徑15cm，長度17cm）加入 3,000 個孢子。河砂先以 2 mm 網目過篩並經高溫高壓滅菌，滅過菌之河砂放置二個月始進行菌根繁殖工作，每個處理 3 重複，生長期間 6 個月，播種後 2 週後開始施肥，宿主生長至一定階段，去除葉片使其重新生長，至玉米始花後進行斷水處理，放置至土壤水分乾旱（吳和林, 1998）。

2. 不同宿主與介質對菌根菌種源產孢量之影響

利用不同介質與宿主繁殖叢枝菌根菌，介質為河砂，宿主則分別為百喜草、玉米與四瓣馬齒莧（扦插），叢枝菌種為 *Glomus* spp. 菌種，每5吋盆砂土加入 3,000 個孢子。其餘如上述。

分析方法

（一）土壤分析

於臺南本場土壤肥料研究室進行導電度、pH、有機質含量及主要與次要元素測定。土壤導電度以土：水＝1：5作成懸浮體，過濾後，以導電度計(US597型)測定。pH值以土：水＝1：1，平衡一小時後以玻璃電極法測定。有機質以總有機碳分析儀(TOC)測定。土壤磷以Bray No.1抽出，鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅及鈉以Mehlich No. 3抽出後用感應耦合電漿原子發射光譜儀(ICP)測定。

（二）鮮乾重檢測

新鮮和乾葉重量（g），新鮮和乾根重量（g）。在 80 ℃ 烘箱中乾燥下 48 小時（所需要的時間，以獲得恆定的重量），測定乾重。

（三）植體分析方法參考 Methods of Soil Analysis (Bigham and Bartels, 1996)

植體經 70 ℃ 烘乾 48 小時。以磨碎機 (榮聰牌 RT-04 ， 1200 W ，25000 RPM) 將樣品磨碎，養分總量分析，氮為烘乾粉碎後直接以元素分析儀 (Elementar vario ELⅢ) 進行測定，磷、鉀、鈣、鎂為取烘乾植體經濕式分解後，磷以鉬藍法測定，鉀、鈣、鎂、鈉以感應電漿水譜儀 (Inductively Coupled Plasma Emisson Spectrophotometer , ICP，JY ULTIMA 2) 測定之並以標準溶液校正。

（四）菌根孢子數檢測

稱取 10 g 接種劑至於 2 L 塑膠量杯，以強勁水流沖洗，待接近滿水位時靜置 10~15 秒，然後將上層液倒入篩網組中， 60 、 120 及 400 篩目 (mesh) 之篩網各一個，依篩孔大小，由上而下排列。重複 3 ~ 5 次，然後將篩出物用洗瓶移入離心管，加入適量水於離心管，攪拌後以 3,000 rpm 轉速離心 5 分鐘後，取下層沉積物，加入 40 ％ 蔗糖液，混勻後，以 3,000 rpm 轉速離心 1 分鐘。將糖液倒入 400 篩目之篩網中，以清水將糖液洗淨，並將篩網內孢子移入培養皿中，再以解剖顯微鏡計算孢子數 (吳和林, 1998) 。

1.材料：

(1) 篩網 I (250 µm：60 mesh)

(2) 篩網Ⅱ (125 µm：120 mesh)

(3) 篩網Ⅲ (60 µm：230 mesh)

(4) 篩網Ⅳ (37 µm：400 mesh)

(5) 2 公升燒杯壹個

(6) 40 ％ 糖液

(7) 解剖顯微鏡壹台 (倍率 75 × ~ 70 ×)

(8) 培養皿 (Petrl Dish)

(9) 微量吸管 (micropipette) 或玻離滴管

(10) 離心機 (低速) ： max. 5000 rpm

2.方法：

(1) 秤 10 g 菌土置於 2 公升之燒杯中。

(2) 以強勁水流沖洗土壤，水位接近滿時，靜置 20 秒。

(3) 將上層液倒入篩網組（ 網孔 120 µm~ 270 µm）中。

(4) 重複步驟 1~3 ， 1 或 2 次。

3.將各篩網中的沉積物處理如下：

(1) 篩網 I （120 µm）：

a. 第一層篩出物直接以清水清洗後，直接移到培養皿中。

b. 篩出物在解剖顯微境下直接觀察有無孢子或孢子果出現。

(2) 篩網 II （270 µm）：

a. 將下層篩網中濾篩物洗到離心管中。

b. 離心管加水，並以 3000 rpm 速度離心 3 min。

c. 傾倒上層液並留置下層沉積層。

(3) 沉積層【含孢子及其它雜質】

(4) 下層液：含孢子及少部分的雜質（ 加 40 ％ 糖水 ）

a. 將下層沉積物以 40 ％ 糖水沖洗，並以 3000 rpm 速度離心 2 min（ 分鐘 ）。最後再以水洗下濾篩物移入培養皿中。

(5) 置入培養皿中鏡檢：

a. 根據孢子的大小，顏色及外表形態做初步的分類。

b. 將不同類型的孢子挑出製玻片。

【註】： 40 ％ 糖液： 40 g 的糖＋ 60 ml H_2O。

結果與討論

接種叢枝菌根菌對文旦柚生育之影響

進行菌根文旦柚育苗，文旦苗接種菌根菌有較佳生長勢，定植後每月量測株高，以接種 *Glomus etunicatum* 表現最高，*Gigaspora* sp.次之，對照組最低（圖 1 及表 1）。

圖 1.文旦柚接種菌根菌均較未接菌處理有較佳生長勢(左二起)

CK: Non-mycorrhizal control ;

Gg: *Gigaspora* sp. ; ASP : *Acaulospora* sp.

Ge : *Glomus etunicatum.*;

Gm : *Glomus mosseae*

表 1. 接種不同叢枝菌根菌對文旦柚生育之影響

Table 1. The effect of waterloging stress on the growth of wentan pomelo inoculated with different AMFs.

Inoculant	Plant height (cm)	Numbers of leaf
CK	107	63
G.g.	128	67
Asp.	123	77
G.e.	129	75
G.m.	116	74

CK: Non-mycorrhizal control ; G.g.: *Gigaspora* sp. ;
Asp. : *Acaulospora* sp.; G.e. : *Glomus etunicatum*.; G.m. : *Glomus mosseae*

文旦柚穴植盤菌根苗在浸水逆境下之影響

文旦柚苗進行浸水逆境試驗，結果顯示無論浸水與否，接種 *Glmous mosseae* 處理有較佳生長勢（圖 2），且浸水逆境下，菌根文旦柚地上部與根部所有營養元素含量均較未接菌者為高（表 3 與 5）。

叢枝菌根菌是植物健康和植物生長中最有效根圈的構成要素。菌根真菌是一種植物根系和一些真菌以連續的方式相互共生的生活，已被確定這種共生的增加植物對環境逆境和栽培逆境因素等的抗性（Sensoy *et al*., 2013）。鉀為一滲透調節離子，鈣離子在植物生理代謝扮演一個重要角色，及對環境逆境反應，包括在水分和溶質間透過影響細胞膜構造和氣孔功能，細胞分裂與細胞壁合成，植物防禦和修補生物和非生物性逆境系統間直接訊號角色 (Hu and Schmidhalter , 2005 ; Al-Karaki *et al*., 2001) 。許多研究指出浸水處理植物體鉀與鈣離子累積和耐逆境性有關，與本試驗結果相似，接種菌根菌可以增加養分吸收促進文旦柚生長勢。

圖 2. 接種菌根菌可提昇文旦柚耐浸水逆境
-W : Normal water supply ; +W : Flooding stress ;
CK : Non-mycorrhizal; G.m. : *Glomus mosseae*

表 2. 接種不同叢枝菌根菌對文旦柚在浸水逆境地上部養分濃度之影響

Table 2. Influence of waterloging stress on shoots mineral elements concentration of wentan pomelo inoculated with different AMFs.

Water satus	Inoculant	N（%）	P（%）	K（%）	Ca（%）	Mg（%）
－w	CK	1.61	0.19	2.15	1.48	0.23
	G.m.	1.86	0.17	1.95	1.67	0.21
＋w	CK	1.58	0.17	2.14	1.68	0.22
	G.m.	1.75	0.22	2.03	1.98	0.25

-W : Normal water supply ; +W : Flooding stress ; CK : Non-mycorrhizal;
G.m. : *Glomus mosseae*

表 3. 接種不同叢枝菌根菌對文旦柚在浸水逆境地上部養分含量之影響

Table3. Influence of waterloging stress on shoots mineral elements content of wentan pomelo inoculated with different AMFs.

Water satus	Inoculant	N（%）	P（%）	K（%）	Ca（%）	Mg（%）
－w	CK	2.73	0.31	3.59	2.52	0.35
	G.m.	2.82	0.25	3.03	2.62	0.31
＋w	CK	2.02	0.21	2.59	2.12	0.29
	G.m.	4.48	0.54	5.03	5.11	0.63

-W : Normal water supply ; +W : Flooding stress ; CK : Non-mycorrhizal;
G.m. : *Glomus mosseae*

表 4. 接種不同叢枝菌根菌對文旦柚在浸水逆境地下部養分濃度之影響

Table 4. Influence of waterloging stress on roots mineral elements concentration of wentan pomelo inoculated with different AMFs.

Water satus	Inoculant	N（%）	P（%）	K（%）	Ca（%）	Mg（%）
－w	CK	1.27	0.17	2.21	0.93	0.35
	G.m.	1.39	0.14	2.15	0.69	0.29
＋w	CK	1.06	0.11	2.05	0.74	0.26
	G.m.	1.07	0.16	1.92	0.72	0.28

-W : Normal water supply ; +W : Flooding stress ; CK : Non-mycorrhizal;
G.m. : *Glomus mosseae*

表 5. 接種不同叢枝菌根菌對文旦柚在浸水逆境根部養分含量之影響

Table 5. Influence of waterloging stress on roots mineral elements content of wentan pomelo inoculated with different AMFs.

Water satus	Inoculant	N（%）	P（%）	K（%）	Ca（%）	Mg（%）
－w	CK	0.87	0.11	1.53	0.65	0.23
	G.m.	0.78	0.08	1.19	0.41	0.15
＋w	CK	0.61	0.09	1.14	0.43	0.18
	G.m.	1.07	0.17	1.93	0.76	0.32

-W : Normal water supply ; +W : Flooding stress ; CK : Non-mycorrhizal;
G.m. : *Glomus mosseae*

文旦果園菌根菌分離與種源繁殖

（一）文旦果園菌根菌分離與種源繁殖

於 3 個不同地區文旦果園採取土壤樣品，進行菌根菌孢子分離，調查結果顯示每公克土孢子量介於 0.3~2.1 spores ，表土菌根孢子數高於底土，且以有草生栽培最高（表 6）。由土壤分析資料顯示菌根菌數量可能與磷或有機質含量有關（表 7）。菌種經鑑定為 *Glomus intraradices*; *Glomus etunicatum*; *Acaulospora morrowiae* 等 3 種。菌根菌種源繁殖，檢測每公克土中孢子數達 150 spores。

目前叢枝菌根的生產方法主要有傳統盆栽法 (post culture) 、氣霧式栽培法(aeroponic culture) 、根器官培養法 (root organ culture) （鄔， 2003）。在進行任何接種試驗前，接種孢子的數目與活力是確保接種效益的主要因素。根器官培養法雖然可生產無雜菌的純種菌源，但目前只有少數菌根菌可以培養成功而未達實用階段。氣霧式菌種繁殖法雖可生產質輕、清潔、無雜菌的新鮮菌根為接種源，但除需增設氣霧設備外，營養液的配製等生產步驟較為繁瑣以及所生產的新鮮根段不耐貯藏等，可能在一般應用上多所受限。傳統盆栽法仍有其操作簡單、方便利用之處，故本試驗均以盆栽法進行菌種繁殖。

（二）不同宿主與介質對菌根菌種源產孢量之影響

在叢枝菌根菌接種源繁殖技術之研究，利用不同介質與宿主繁殖叢枝菌根菌，進行產孢量調查，資料顯示以玉米與百喜草有較高產孢量，孢子數為 165 spores g^{-1}，另亦發現若以果園草生植物四瓣馬齒莧為繁殖宿主，則單一宿主較兩種宿主作物有較高產孢量（表8）。因為菌根菌系利用植物光合產物來輔助根系吸收無機養分，故利用不同介質與宿主來繁殖菌根菌，可得到不同產孢量。

表 6. 不同文旦果園土壤菌根菌孢子數

Table 6. The spores of AMF in different wentan pomelo orchard.

Districts	Soil samples	Spore no. (spores g^{-1})
麻豆1	表土	1.0
	底土	0.8
麻豆2	表土	1.5
	底土	0.6
麻豆3	表土	1.8
	底土	0.7
麻豆4	表土	2.1
	底土	1.8
斗六	表土	1.1
	底土	0.3

表7. 不同文旦柚果園土壤成分分析

Table 7.　Analysis of different wentan pomelo orchard soil.

Treatment	EC（1:5） (dS/m)	pH （1:1）	OM （g kg^{-1}）	Bray-1P (mg kg^{-1})	Ex. K (mg kg^{-1})	Ex. Ca (mg kg^{-1})	Ex. Mg (mg kg^{-1})
麻豆 1							
表土	0.25	6.48	4.02	228	157	2056	250
底土	0.27	5.29	2.25	115	137	976	168
麻豆 2							
表土	0.30	7.45	3.25	75	240	2443	379
底土	0.22	7.71	2.67	79	117	3016	417
麻豆 3							
表土	0.39	7.82	2.37	53	198	3350	450
底土	0.35	7.95	2.21	29	88	2583	418
麻豆 4							
表土	0.69	7.17	3.76	322	391	4014	497
底土	0.59	7.60	2.59	348	324	4276	596
斗六							
表土	0.60	6.60	3.39	373	449	3543	391
底土	0.80	6.29	4.90	443	492	3914	368

表 8. 不同宿主與介質對菌根菌種源產孢量之影響
Table 8. The spores of AMF in differt growth medium and host plants.

Treatments	Spore no.（spores g^{-1}）
四瓣馬齒莧	49 b
四瓣馬齒莧＋百喜草	43 b
四瓣馬齒莧＋玉米	20 c
玉米＋百喜草	165 a

Means within each columnfollowed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

結論

果園管理是一連續性、整體性的工作，不僅是地上部管理，培育健全之根群更是重要，以養成更茂密的根系，增加吸收養、水分之能力，提昇耐逆境能力，促進果實品質及增加競爭力。本試驗瞭解接種菌根菌對文旦柚感染及苗期生育健化情形，同時評估其耐浸水逆境能力，以穩定文旦產業之永續發展。

進行菌根文旦柚育苗，文旦苗接種菌根菌有較佳生長勢，定植後每月量測株高，以接種 *Glomus etunicatum* 表現最佳，文旦柚苗進行浸水逆境試驗，結果顯示無論浸水與否，接種 *Glmous mosseae* 處理有較佳生長勢，且營養含量較未接菌者高。另於 3 個不同地區文旦果園採取土壤樣品，進行菌根菌孢子分離，調查結果顯示每公克土孢子量介於 0.3~2.1 spores ，表土菌根孢子數高於底土，且以有草生栽培最高。菌根菌種源繁殖，檢測每公克土中孢子數達 150 spores，在叢枝菌根菌接種源繁殖技術之研究，利用不同介質與宿主繁殖叢枝菌根菌，進行產孢量調查，資料顯示以玉米與百喜草產孢量較高，達 165 spores/g。

誌　　謝

感謝研究助理施惠淇小姐協助田間管理與試驗記錄工作，及土壤肥料研究室同仁協助各項檢測分析，特別感謝行政院農業委員會農業試驗所農業化學組林素禎博士協助菌根菌種鑑定，使得本試驗得以圓滿執行完成。

參考文獻

1. 王均琍。2007。 菌根菌應用於經濟果樹之栽培農業生技產業季刊 12:43-48。
2. 王議鋒。2000。內生菌根菌接種對柑橘幼苗生長及生理的影響。國立中興大學植物系碩士論文，63頁。
3. 古德業、黃伯恩。1994。生物肥料在永續農業上之應用及展望 微生物肥料之開發與利用研討會專刊 pp.1-4 台灣省農業試驗所嘉義分所

4. 呂斯文。1994。囊叢枝菌根菌之無土介質接種，接種源生產及菌種篩選研究國立臺灣大學園藝學研究所博士論文 pp.172-191。
5. 呂斯文、張簡秀容、張喜寧。1995。利用穴植盤培育番茄菌根苗及其田間生長之反應。中國園藝 41(1)：54-67。
6. 吳繼光、林素禎。1998。囊叢枝內生菌根菌應用技術手冊 台灣省農業試驗所 pp.54。
7. 林素禎、黃山內、洪崑煌、吳繼光。 2000。 微生物接種對苦柚及文旦柚種苗生長之效應。中華農業研究 49(1):63-75。
8. 程永雄、莊明富、許淑麗。1997。囊叢枝菌根菌培育柑橘健康種苗。中華農業研究 46(4):324-332。
9. 黃瑞彰 江汶錦 林經偉 卓家榮 。2011。 菌根菌的特性及田間應用技術 臺南區農業專訊 75：14-19。
10. 張汶肇、吳建銘、吳昭慧。2000。果園草生栽培管理。台南區農業改良場技術專刊 (No.149)pp.83。
11. 張汶肇、林明瑩、林棟樑、卓家榮、陳紹崇。2009。優質麻豆文旦栽培管理技術。台南區農業改良場技術專刊 (No.134)pp.59。
12. 楊秋忠。1990。微生物肥料的種類及其應用品質。農藥世界。81:33-35。
13. 張繼中。2009。菌根菌及有機質肥料在番荔枝肥培管理之應用。豐年。59(23)：44-46。
14. 鄔家琪。2003。 叢枝菌根對設施蔬菜在環境逆境下生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。p.90-112。
15. Abbot,.L.K.and A.D. Robson.1985.The effect of pH on the formation of VA mycorrhiza by two species of Glomus .Aust.J.Soil.Res.23:253-261。
16. Adams, P. 1992. Crop nutrition in hydroponics. Acta Hort. 323:289-305.
17. Koske, R. E. and J. W. Gemma. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizae. Mycol. Res. 92: 486-505.
18. Nzanza, B., Marais, D., Soundy, P., 2012. Response of tomato (Solanum lycopersicum L.) to nursery inoculation with Trichoderma harzianum and arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. Acta. Agr. Scand.B-S P. 62, 209–215.
19. Smith, S.E. and D.J.Read.1997.Mycorrhizal symbiosis,2nd ed.London,1986. Responses of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi at foursoil temperatures and their effects on cotton growth. NewPhytol. 104: 89-95.

Evaluation and Utilization of Arbuscular Mycorrhiza Tothe Growth of Wentan Pomelo in Tainan District

Jui-Chang Huang[1,2]

Abstract

The experiment was conducted to explore the susceptibility of wentan pomelo colonized by endomycorrhiza (*Glomus etunicatum*) and the growth of seedlings, to evaluate the tolerance of wentan pomelo under waterloging stress conditions. Pomelo seedlings inoculated with mycorrhiza have better growth trend than those without inoculation, waterloging stress results showed that when plants ware inoculated with *Glomus mosseae*, they were all grew better than those without inoculation under waterloging stress or not. The inoculated plants were also had higher nutrient content of the soil samples, another pomelo orchards in three different areas were taken, and the mycorrhizal fungi were isolated, the data showed were that the spore amount in the topsoil is more than that in the subsoil. The spore number were between 0.3 and 2.1 spores/g soil, and the orchard with grass cultivation is the highest. In the mycorrhiza vaccination source reproduction technology, the test of different media and hosts to reproduce mycorrhiza showed that bahia grass and corn were better, because 165 spores were observed in one gram of soil sample.

Key word： Biofertilizer; Wentan pomelo; Endomycorrhiza; Waterloging stress

---

1. Corresponding author.
2. Associate Researcher of Tainan DARES, COA.

鳳梨皮經 *Azotobacter beijerinckii* A13 醱酵產出生物肥料及評估對小白菜生長效益之研究

簡宣裕 [1,2] 張明暉 [3] 林素禎 [3] 陳美蓁 [4] 林美娟 [4]

摘要

鳳梨皮泥汁接種 *Azotobacter beijerinckii* A13 於 20℃ 醱酵者有較高的族群數，於 35℃ 醱酵者之族群數低於 10^5 cfu/ml ，於 25℃ 進行醱酵時有較高的 IAA 產出濃度 (1.90μg/ml) 。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液處理者比接種 1:500 、 1:1000 及 1:5000 者有較高的的固氮活性與產出較高濃度的 IAA。鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液 1:100（v:w） 進行醱酵 21 天，固氮活性有隨醱酵時間的增加而減少，但產出的 IAA 濃度則隨時間而增高。鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵，醱酵物的固氮菌族群數、水溶性氮與全氮濃度及 IAA 濃度皆顯著的比鳳梨皮泥汁經高溫高壓滅菌與不滅菌接種菌液者高。鳳梨皮泥汁經 100 ℃ 加熱 30 分鐘， 接種 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵 21 天，醱酵物以 1:20 、 1:10 及 1:5 (w:w) 施用於 0.75 kg 盆栽土壤，種植小白菜，經 30 天後小白菜每棵的鮮重與乾重雖然和對照處理者 (鳳梨皮泥添汁加土壤溶液進行醱酵者) 的鮮重與乾重相較有增加的趨勢，但差異不顯著。

關鍵詞：鳳梨皮。生物肥料。固氮活性。小白菜。

前言

臺灣每年有大量有機廢棄物產生，若不妥善處理會對農業生態、環境造成負面影響，又全世界的能源愈來愈缺乏，生產過程需要耗費大量能源之化學肥料等農業栽培用資材的價格會大幅上升，故開發低耗能且兼具環保功能之綠色肥料是未來必須進行的科技研究工作。本計畫將鳳梨皮接種固氮菌株，以生物轉換產出生物性氮肥，不但可以農業資源物再利用，且可減少農業生產對化學氮肥之依賴性，對於糧食生產與環境之維護極為重要。

---

1. 通訊作者
2. 農委會農業試驗所農化組研究員
3. 農委會農業試驗所農化組助理研究員
4. 農委會農業試驗所農化組研究助理

材料與方法

一、鳳梨皮成份之分析：

測定鳳梨皮以果汁機絞成泥狀然與純水依 1:1（w:v）比例混合後，測定 pH 與 EC 值及總還原糖含量（DNS method）。鳳梨皮以 85 ℃ 烘乾後，測定全量氮、磷及鉀濃度。

二、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 進行醱酵對固氮族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及固氮量影響之探討：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，以 100℃ 加熱 30 分鐘，冷卻後進行下列試驗：

（一）探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 於不同溫度進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

於無菌操作檯，將菌液以 1:100（v:w）接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後置於 20℃、25℃、30℃ 及 35℃ 進行醱酵，經 3 天後取樣品，測定固氮菌族群數、以 GC 測定固氮活性及 HPLC 測定 IAA 濃度。

（二）探討不同比例的 *A. beijerinckii* A13 菌液接種於鳳梨皮泥汁進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

菌液以 1:100、1:500、1:1000 及 1:5000（v:w）接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，置於 25℃ 醱酵，經 3 天後取樣品，測定固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度。

（三）探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 經醱酵不同時間對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度之影響：

於無菌操作檯，將菌液以 1:100（v:w）接種於含鳳梨皮泥汁之 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後置於 25℃ 溫度下醱酵，經 1、3、7、14 及 21 天後取樣品，測定固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度。

三、鳳梨皮泥汁經不同方式滅菌後接種 *A. beijerinckii* A13 進行醱酵對菌族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及水溶性有效氮與全氮濃度影響之探討：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，然後分別以 1.1 atm 壓力配合 121℃ 條件下滅菌 30 分鐘、100 ℃ 加熱 30 分鐘滅菌及不加熱（對照處理），於無菌操作檯冷卻後接種 1:100 (v:w) 菌液，然後置於 25℃ 溫度下進行醱酵，經 21 天後，取樣品測定固氮菌族群數、固氮活性、產出 IAA 濃度及水溶性有效氮與全氮濃度。

四、鳳梨皮泥汁經 *A. beijerinckii* A13 醱酵後產物對盆栽小白菜生長之效益評估：

（一）探討鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液進行醱酵對醱酵產物水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度之影響：

8.5 g 鳳梨皮泥與 41.5 ml 水混合為鳳梨皮泥汁，調酸鹼值為 pH 7，置於 125 ml 玻璃錐形瓶內，以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，冷卻後，於無菌操作檯接種 1:100 (v:w) 菌

液或土壤溶液，進行醱酵 21 天後取樣品，測定水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度。

（二）盆栽土壤施用鳳梨皮泥汁醱酵產物對小白菜鮮重與乾重的影響：

將實施方法 四(一) 製備後之鳳梨皮醱酵產物（以鳳梨皮泥汁添加土壤溶液進行醱酵之產物為對照），以 1:20 、 1:10 及 1:5 (w:w) 施用於 0.75 kg 盆栽土壤， 4 重複，種植小白菜，於種植 30 天後採收，測定地上部鮮重與乾重，以評估對盆栽蔬菜生長之效益。

結果與討論

一、鳳梨皮之成份含量：

鳳梨皮經分析後，得知其水分含量為 84.4%、酸鹼值與電導度值 (1:1, w:v) 為 pH4.08 與 4.69 (mS/cm) 、全氮、全磷及全鉀濃度分別為 9.6 mg/g 、 1.85 mg/g 及 1.44 mg/g ，還原糖農度為 0.42 mg/g 。

二、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁以 100℃ 加熱 30 分鐘後接種 *A. beijerinckii* A13 菌液，於不同溫度進行醱酵 3 天後，得知固氮菌族群數以於 20℃ 醱酵者較多，其次為於 25℃ 與 30℃ 醱酵者，族群數皆高於 10^8 cfu/ml ，而於 35℃ 醱酵者之固氮菌族群數低於 10^5 cfu/ml (圖 1) ，由此可以知道 20℃ 至 30℃ 適合固氮菌 *A. beijerinckii* A13 於鳳梨皮泥汁生長；於 25℃ 醱酵有較高的固氮活性 (3,135ηmole/hr・flask) ，其次於 20℃ 醱酵者，皆顯著高於 30℃ 醱酵者，而於 35℃ 醱酵者的固氮活性則測不出固氮活性 (圖 2) ；於 25℃ 進行醱酵有較高的 IAA 濃度 (1.90µg/ml) 產出，其次為於 30℃ 進行醱酵者，皆顯著比於 35℃ 進行醱酵者高，而於 20℃ 醱酵者的 IAA 濃度則測不出 (圖 3) 。

三、鳳梨皮泥汁接種不同比例固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁以 100℃ 加熱 30 分鐘，接種不同比例（v:w）*A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵，以鳳梨皮泥汁接種 1:100 、 1:500 及 1:1000 菌液者皆比接種 1:5000 菌液者有較多的固氮菌族群數 (圖 4) 。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液者的固氮活性 (847ηmole/hr・flask) 為較高，其次依序為接種 1:500 、 1:1000 及 1:5000 菌液者 (圖 5) 。鳳梨皮泥汁接種 1:100 菌液，進行醱酵，所產出的 IAA 濃度 (7.43µg/ml) 為較高，比鳳梨皮泥汁接種 1:1000 與 1:5000 菌液者顯著的高；而鳳梨皮泥接種 1:5000 菌液，進行醱酵，醱酵產物則測不到 IAA 的濃度 (圖 6) 。

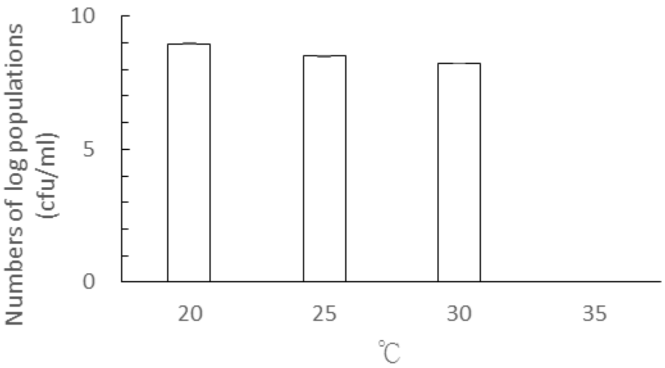


圖 1.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下繁衍 3 天後之族群數。

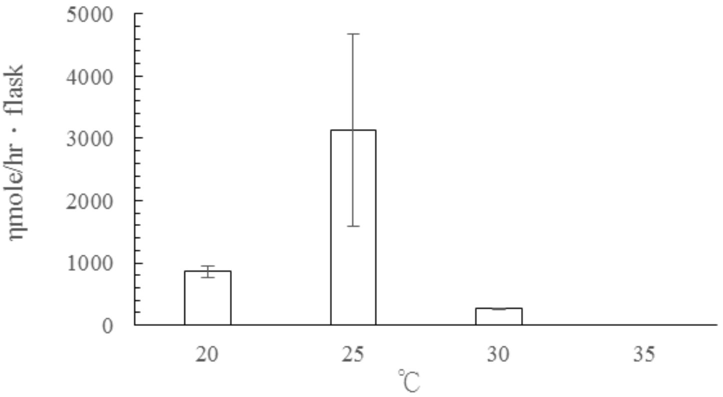


圖 2.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下進行醱酵 3 天後之固氮活性。

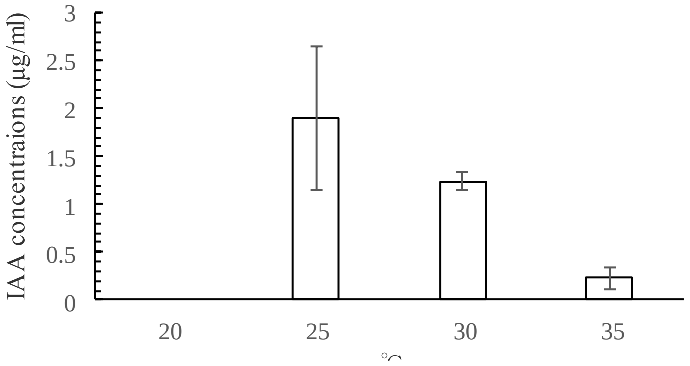


圖 3.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液於不同溫度下進行醱酵 3 天後產出之 IAA 濃度。

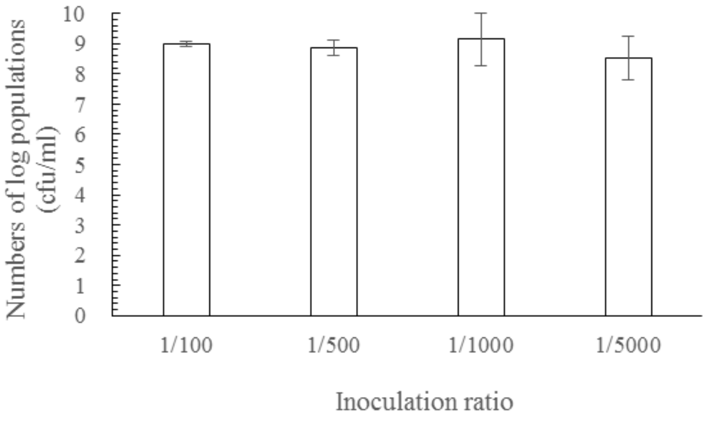


圖 4.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後之族群數。

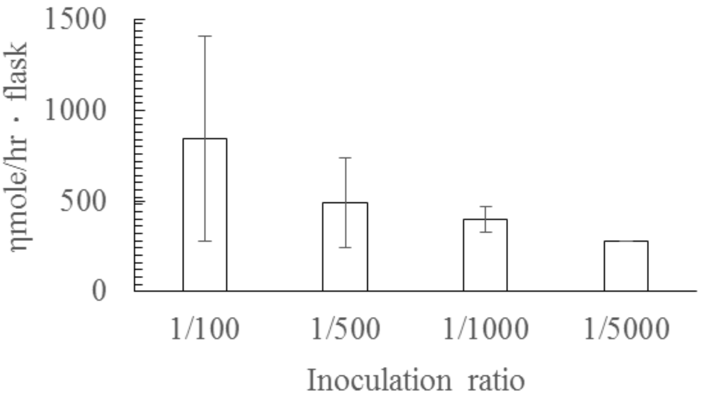


圖 5.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後之固氮活性。

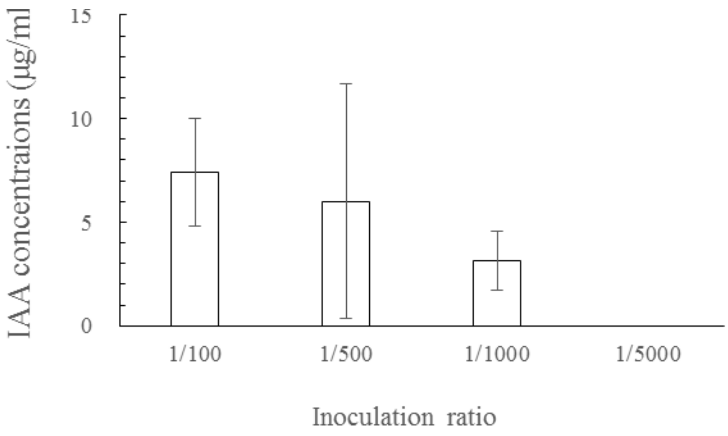


圖 6.鳳梨皮泥汁接種不同比例 *A. beijerinckii* A13 菌液經 3 天後所產出之 IAA 濃度。

四、鳳梨皮汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵不同時間對固氮菌族群數、固氮活性及 IAA 濃度的影響：

鳳梨皮泥汁接種 1:100 （v:w） *A. beijerinckii* A13 菌液，經醱酵 3 天與 7 天時有較高的固氮菌族群數 (10^9 cfu/ml 以上) ，比醱酵 1 天、 14 天及 21 天時的固氮菌族群數顯著的高，醱酵至 21 天時菌族群數仍維持 $10^{8.9}$ cfu/ml (圖 7) 。醱酵第 1 天時的固氮活性 (3,139ηmole/hr · flask) 顯著的比其他醱酵時間者較高，固氮活性有隨醱酵時間的增加而減少的現象，於醱酵第 14 天時固氮活性明顯的驟降 (圖 8) 。鳳梨皮泥汁接種菌液，經醱酵 1 天時測不出 IAA 的濃度，但隨醱酵的時間增加， IAA 的產出濃度會顯著的增加，於進行醱酵 21 天時 IAA 的產出濃度較高為 88.4μg/ml (圖 9) 。

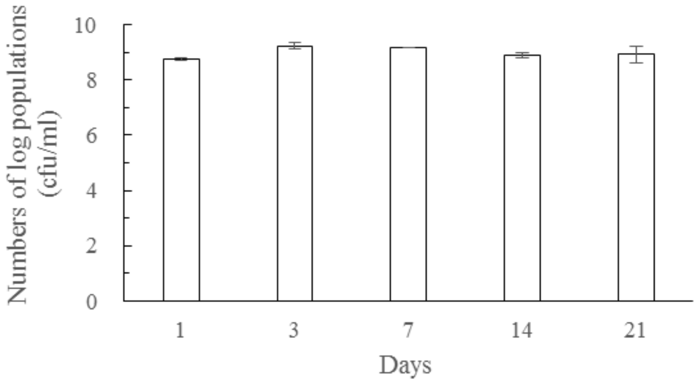


圖 7.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後之族群數。

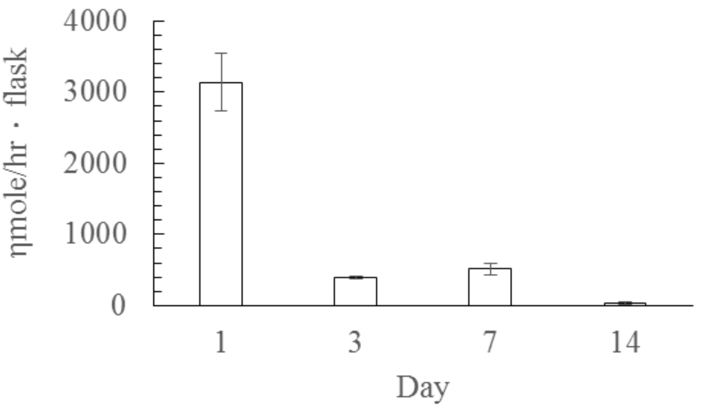


圖 8.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後之固氮活性。

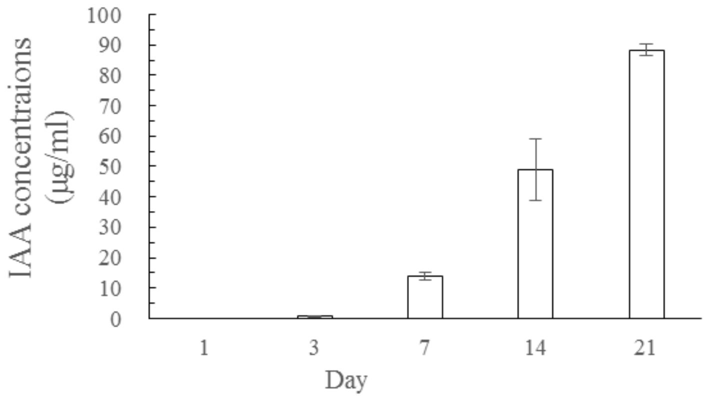


圖 9.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經不同天數後所產出之 IAA 濃度。

五、鳳梨皮泥汁以不同方式滅菌，接種 1:100 （v:w） *A. beijerinckii* A13 菌液，經醱酵後對固氮菌族群數、 IAA 產出的濃度及水溶性有效氮與全氮濃度之影響：

鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵 21 天時固氮菌的族群數仍有 $10^{8.47}$ cfu/ml ，而經高壓高溫滅菌與不滅菌的鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液，進行醱酵後的固氮菌族群數皆少於 10^{5} cfu/ml (圖 10) 。鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液，進行醱酵，醱酵液的水溶性氮濃度為 0.056 mg/ml ，是未接種菌液者濃度的 3.1 倍；經高溫高壓滅菌與不滅菌的鳳梨皮泥汁接種菌液，而進行醱酵後所產出的水溶性有效氮濃度分別為 0.04 mg/ml 與 0.01 mg/ml，與未接種菌液者相較皆差異不顯著，可見鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘方式滅菌配合接種固氮菌菌液，進行醱酵，較能產出水溶性有效性氮 (圖 11) 。鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的全氮濃度為 0.4mg/ml ，較未接種固氮菌菌液者增加 15.3% ；鳳梨皮泥汁經高溫高壓滅菌與不滅菌，接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的全氮濃度分別為 0.36 mg/ml 與 0.37 mg/ml，與未接種固氮菌菌液者相較皆差異不顯著，可見鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘配合接種固氮菌菌液，進行醱酵，較能增加醱酵產物的全氮濃度 (圖 12) 。鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種固氮菌菌液進行醱酵所產出的 IAA 濃度為 34.7 mg/ml ，顯著的比不滅菌之鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液進行醱酵所產出的 IAA 濃度高；而鳳梨皮泥汁以高壓高溫滅菌後接種固氮菌菌液進行醱酵，醱酵產物的 IAA 濃度則測不定 (圖 13) 。

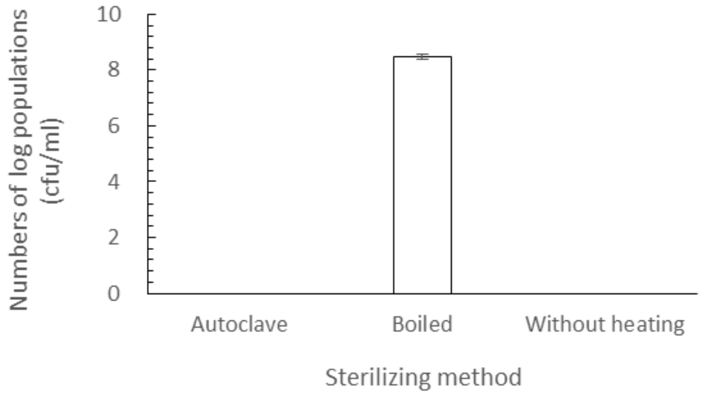


圖 10.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之族群數。

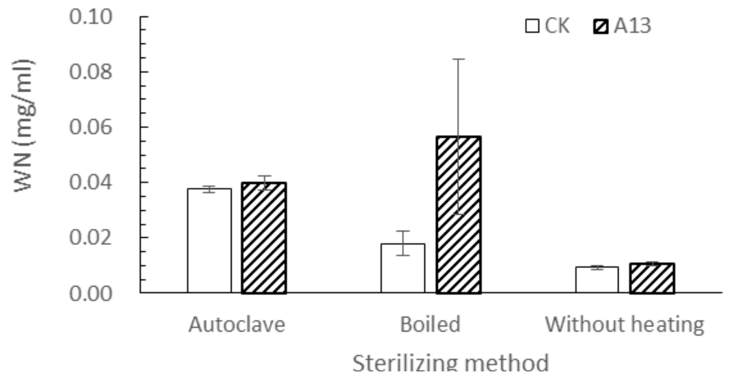


圖 11.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之有效氮濃度。

圖 12.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後之全氮濃度。

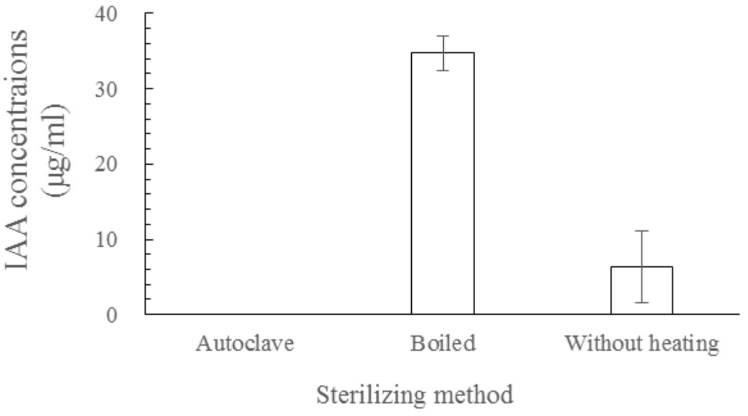


圖 13.以不同方式滅菌之鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液經醱酵 21 天後所產出之 IAA 濃度。

六、鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵之產物對盆栽小白菜生長之效益：

(一)鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵對醱酵產物之水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度之影響:

鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液，進行醱酵後所產出的水溶性有效氮與全氮濃度為 0.033 mg/ml 與 0.429 mg/g ，分別為鳳梨皮泥汁添加土壤溶液，進行醱酵後所產出者的 2.36 倍與 1.53 倍 (圖 14 與圖 15) 。鳳梨皮泥汁接種固氮菌菌液，進行醱酵後所產出的 IAA 濃度為 15 μg/ml，而鳳梨皮泥汁添加土壤溶液，進行醱酵後所產出的 IAA 濃度則測不到。由此可以知道鳳梨皮泥汁接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液比添加土壤溶液，能有效增加醱酵產物中之水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度。

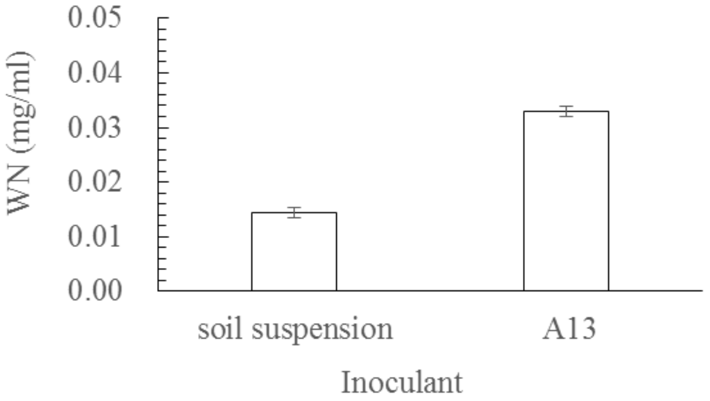


圖 14.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後之有效氮濃度。

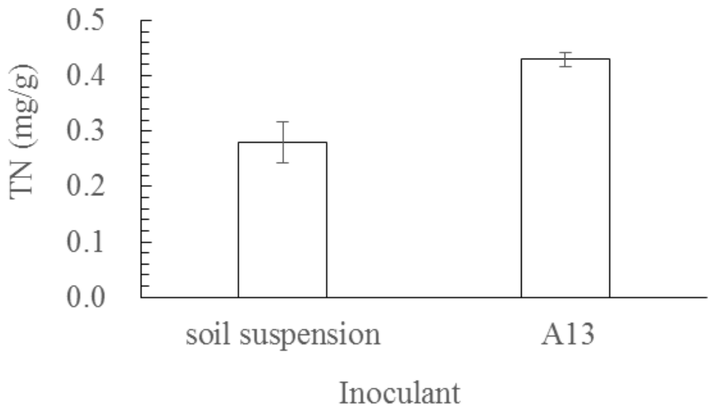


圖 15.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後之全氮濃度。

(二)鳳梨皮泥汁經接種固氮 *A. beijerinckii* A13 菌液或添加土壤溶液進行醱酵之產物對盆栽小白菜鮮重與乾重之影響:

鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘,接種 *A. beijerinckii* A13 菌液,進行醱酵 21 天後,將醱酵產物（以鳳梨皮添加土壤溶液進行醱酵之產物為對照）以 1:20 、 1:10 及 1:5 (w:w) 與盆栽土壤混合,然後種植小白菜,經 30 天後採收植株地上部,小白菜每棵的鮮重與乾重分別為 19.4 g 、 17.2 g 及 13.9 g 與 2.97 g 、 2.49 g 及 1.71 g ,雖然分別和對照者的鮮重與乾重比較,差異不顯著,但是產量仍有增加的趨勢;施用於盆栽土壤的鳳梨皮泥汁醱酵物愈多,小白菜的產量反而愈少 (圖 16 與圖 17) ,此可能與醱酵物之酸鹼值為 pH 8.2-8.4 電導度為 2.4-2.5 mS/cm,大量施用時會不利於小白菜生長有關,不過其真正原因則有待探討。

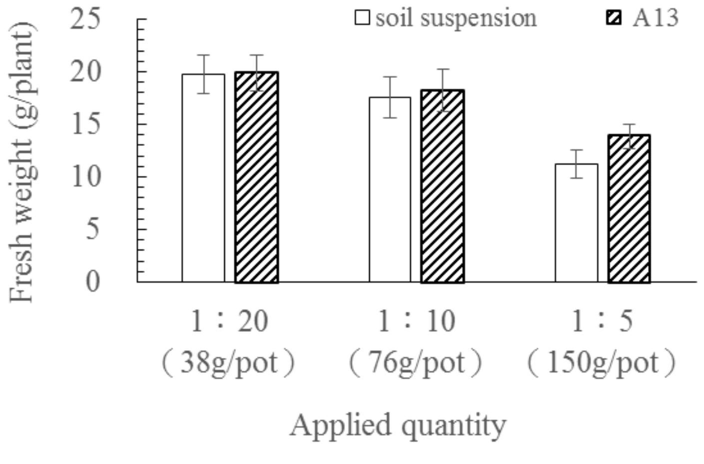


圖 16.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後以不同量與盆栽土壤混合對小白菜鮮重的影響。

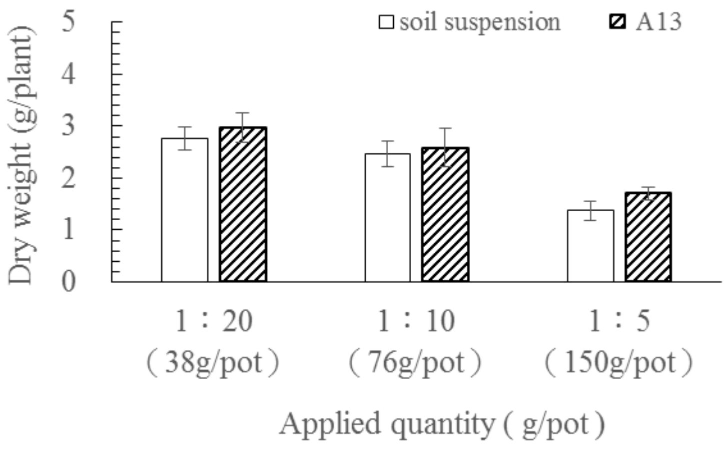


圖 17.鳳梨皮泥汁接種 *A. beijerinckii* A13 菌液或土壤溶液經醱酵 21 天後以不同量與盆栽土壤混合對小白菜乾重的影響。

結論

鳳梨皮泥汁以 100 ℃ 加熱 30 分鐘，接種固氮菌 *A. beijerinckii* A13 菌液進行醱酵後之產物，皆比鳳梨皮泥汁添加土壤溶液進行醱酵後之產物 (對照處理） 顯著增加水溶性有效氮、全氮及 IAA 濃度，醱酵後之產物以 1:20 、 1:10 及 1:5 (w:w) 與盆栽土壤混合，種植小白菜經 30 天後採收，小白菜每棵的鮮重量與乾重量分別比盆栽土壤混合對照處理醱酵物者重，但差異不顯著。施用於盆栽土壤之鳳梨皮泥汁醱酵物愈多，小白菜的產量反而愈少，其原因有需要進行後續之試驗加以瞭解。

參考文獻

1.Bishop, P. E., Jarlenski, D. M. ＆ Heterington, D. R. 1982. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology 150:1244-1251.

2.Bretrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Toraine, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.) Canadian Journal of Microbiology 46:229-236.

3.Deepak, and Lal, G. 2009. Integrated strategy to control wilt disease of cumin (Cuminum cyminum L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cumini (Schlecht) Prasad ＆ Patel. Journal of Spices and Aromatic Crops 18 (1):13-18.

4.Deubel, A. and Merbach, W. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In Soil Biology v(3):Microorganisms in soils and roles in genesis and functions pp:177-191. Ed. by F. Buscot and A. Varma. Berlin, Heidelberg.

5.Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry 27:257-263.

6.Mail, G.V. and Bodhankar, M.G. 2009. Antifungal and phytohormone production potential of

Azotobacter chroococcum isolates from groundnut (Arachis hypogea L. Rhizosphere). Asian J. Exp. Sci. 23(1)1: 293-297.

7. Suneja, S., Narula, N., Anand, R. C. and Lakshminyana, K. 1996. Relationship of *Azotobacter chroococcum* siderophores with nitrogen fixation. Folia Microbiology 41:154-158.
8. Tindale, A. E., Mehrotra, M., Ottem, D. and Page, W. J. 2000. Dual regulation of catercholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. Microbiology 146:1617-1626.
9. Verma, S., kumar, V., Narula N. and Merbach, W. 2001. Studies on in vitro production of antimicrobial substances by *Azotobacter chroococcum* isolates/mutants. Journal of Plants Diseases and Protection 108:152-165.

Pineapple Peel Fermented by *Azotobacter Beijerinckii* A13 to Develop Bio-fertilizer and Assessed Its Effect on The Growth of *Brassica Chinensis* Linn

Shiuan-Yuh Chien, Ming-Huei Chang, Sue zeng Lin, Mei-Jean Chen, and Mei-Chien Lin
Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Abstract

Boiled pound pulpy of pineapple peel inoculated with *Azotobacter beijerinckii* A13 incubated under 25℃ attained higher population and IAA concentration. Boiled pound pulpy of pineapple peel inoculated with the bacterial suspension at a ratio (v:w) of 1:100 and incubated under 25℃ got higher nitrogen-fixing activity and IAA concentration than those of inoculated with the bacterial suspension at ratios of 1:500, 1:1000 and 1:5000. Pound pulpy of pineapple peel boiled and inoculated with *Azotobacter beijerinckii* A13 fermented with 21 days, the nitrogen-fixing activity was deceased and IAA concentration was increased with time. The population of *Azotobacter beijerinckii* A13, available and total nitrogen concentrations and IAA concentration of pound pulpy of pineapple peel boiled 30 minutes and inoculated with the bacterium were higher than those of pound pulpy of pineapple peel sterilized with 121℃ and 1.1 atm condition and non-sterilized. The fresh and dry weights of *Brassica chinensis* Linn planted in pot soil applied with pound pulpy of pineapple peel boiled and fermented by the bacterium 21 days at ratios of 1:20, 1:10 and 1:5 were higher than those of *Brassica chinensis* Linn planted in pot soil applied with pound pulpy of pineapple peel boiled and added with soil suspension .

Key words: *Azotobacter beijerinckii*, Pineapple peel, Bio-fertilizer, Nitrogen-fixing activity, *Brassica chinensis* Linn.

---

1. Corresponding author.
2. Researcher, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Assistant, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.

叢枝菌根菌在作物生長效益之回顧

林素禎[1,2]、吳繼光[3]、簡宣裕[4]

摘要

叢枝菌根菌在過去有益於作物生長的報告發表甚多，但在田間應用上卻不一定能發揮效果，本篇論文整理了植物的種類與品種、叢枝菌根菌的種類以及土壤磷含量對叢枝菌根菌在作物生長效益之影響，探討影響叢枝菌根菌在作物生長效益之因子，期能使作物在生產上得到叢枝菌根菌最大的助益。由前人研究中可知，栽培種作物對叢枝菌根菌的依賴度低於野生種作物；陸生品系與野生品系對叢枝菌根菌的依賴度比高產量的品系高，現代栽培品系比原始品系對叢枝菌根菌的依賴度低；不同叢枝菌根菌種類與品系對作物的生長效益亦受到作物種類與品種之影響；在低磷含量的栽培介質中，叢枝菌根菌可促進作物生長，磷含量越高，作物對叢枝菌根菌的依賴度降低。現代育種模式所選育出的品種或品系大多對叢枝菌根菌依賴度低，無法充分利用叢枝菌根菌的優勢，未來應在低養分與逆境下進行品種與品系的選育，才能選出與叢枝菌根菌親合性高的作物，使叢枝菌根菌在作物的生長效益達到最大。

關鍵詞：叢枝菌根菌、作物品種、作物品系、磷

前言

叢枝內生菌根菌，可與許多的植物形成菌根。從苔蘚植物，蕨類植物，裸子植物到被子植物。從一般陸生植物，耐鹼植物，水生植物到旱生植物。而根據德國斯爾丁教授 (Sieverding 1991) 的估計，在熱帶植物中，約有 13.4%為非菌根植物，70.9%為叢枝內生菌根植物，15.7%為其它菌根植物。農作物如瓜類 (木瓜、洋香瓜、西瓜、苦瓜、絲瓜等)、茄科 (蕃茄、青椒、甜椒、茄子等)、豆科(大豆、矮性四季豆、紅豆、豌豆等)、菊科 (萬壽菊、菊花、非洲菊、孔雀草、霍香薊、大理菊、蟛蜞菊、金盞花等)、香蕉、柑橘、玉米、蘆筍、蔥、茶、百日草、矮牽牛、百合，一串紅、西洋櫻草、繁星花、馬櫻丹、雪茄花、火鶴花、海竽等不勝枚舉，皆可與叢枝內生菌根菌共生。在森林苗木方面如銀杏、紅檜、臺灣杉、巒大杉、紅豆杉、牛樟、臺灣扁柏、楓香、柳杉、小葉南洋杉、相思樹等也是可形成囊叢枝內生菌根。叢枝菌根菌能幫助宿主廣泛地吸收土壤中的養分特別是磷肥，進而對作物有促進生長的效用，

[1] 通訊作者：linmay@tari.gov.tw

[2] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣。台中市。

[3] 農委會農業試驗所農業化學組前副研究員。台灣。台中市。

[4] 農委會農業試驗所農業化學組研究員。台灣。台中市。

此外，叢枝菌根菌可提高植物幼苗移植的存活率，加速幼苗的生長，提早開花，增加花朵數及花朵大小，延長切花的插花壽命，幫助植物抵抗逆境等(吳與林 1998)。台灣目前市面上雖有數家廠商有菌根菌商品出售，但僅有 1 家廠商向農糧署申請登記證。

叢枝菌根菌有益於作物生長的作用在過去研究甚多，然叢枝菌根菌在田間應用上，卻不一定能發揮效果，這主要是因為叢枝菌根菌會受到環境因子的影響，如：植物的種類、植物的品種、叢枝菌根菌的種類與土壤的環境，土壤的環境包括土壤質地、土壤有機質、土壤 pH、氮肥施肥量、磷肥施用量、土壤微生物等，另外，乾旱、浸水與病害等逆境，皆會影響叢枝菌根菌的促進效益。本篇論文整理有關叢枝菌根菌對作物生長效益之研究，期能使作物在生產上得到叢枝菌根菌最大的助益。

一、不同植物種類與品種對叢枝菌根菌依賴度之影響

根據Schüßler等人 (2001) 報導指出，陸生植物有80%與叢枝菌根菌共生，叢枝菌根菌可幫助植物吸收更多土壤營養元素，特別是磷以及微量元素，例如：銅與鋅 (Smith and Read 1997)。菌根菌對植物生長的促進效益會受到植物種類、菌根菌種類，以及土壤環境的影響。Baylis (1975) 首先報導木蘭科植物Magnolioid對菌根菌的依賴度很強，藉由菌根菌的共生，可幫助Magnolioid吸收磷，但若Magnolioid的種類不同，菌根菌幫助其吸收磷的效益亦不相同。Gerdemann (1975) 對菌根菌依賴度 (mycorrhizal dependency, MD) 定義為：在特定的土壤肥力下，植物與菌根菌共生可產生的最大生長或最大產量。Plenchette等人 (1983) 對菌根菌依賴度的定義如下：

Mycorrhizal dependency (%) = [(dry weight of mycorrhizal plant
− dry weight of non-mycorrhizal plant)/ dry weight of mycorrhizal plant] X 100

Plenchette等人 (1983) 所創的菌根依賴度 (Mycorrhizal dependency) 被後來的研究人員廣為使用。Hetrick等人 (1992) 以無菌根植物乾重取代菌根植物乾重作為上述方程式之分母，稱為生長反應 (growth response)，其方程式如下：

Growth response (%) = [(dry weight of mycorrhizal plant
− dry weight of non-mycorrhizal plant)/ dry weight of non-mycorrhizal plant] X 100

Tawaraya (2003) 整理了前人報導過的250種植物對菌根的依賴度，Tawaraya (2003) 根據植被種類與土地利用將這些植物分為田間植物群 (field crop group)、飼料作物群 (forage crop group)、野草群 (wild grass)、非禾本科植物群 (forb group) 與林木群 (tree group)，這250種植物對菌根的依賴度平均為56%，在這些文獻報導中，土壤磷濃度是主要的植物生長限制因子，若還有其他生長限制因子，如微量元素、土壤含水量等因子存在，則菌根的依賴度會比較高。在上述五個植物群中，田間植物群 (field crop group) 的菌根依賴度最低 (44%)，而林木群 (tree group) 的菌根依賴度最高 (79%)，飼料植物群 (forage crop group) 的菌根依賴度為 (56%)，野草群 (wild grass) 與非禾本科植物群 (forb group) 的菌根依賴度為 (70%)。

在田間植物群 (field crop group) 中，網紋瓜 (Cucumis melo)、燕麥 (Avena sativa) 與小麥 (Triticum spp.) 的菌根依賴度為負值。由這些整理的資料中顯示：栽培種植物對菌根的依賴度比野生種植物低。在同一類群植物中，不同植物種類，其菌根依賴度亦不相同，例如：田間植物群 (field crop group) 中，韭蔥 (Allium porrum) 在土壤磷為100 mg/kg時之菌根依賴度為96%，而在相同的土壤磷濃度下，燕麥 (Avena sativa) 的菌根依賴度為−22%。

同種植物不同品種，其菌根依賴度亦有差異。Hetrick等人(1992) 調查小麥 (Triticum aestivum) 23個品種，其菌根依賴度最大為50，最小為−15%，平均為17%。野生品系(wild lines)、原始品系(primitive lines)與現代栽培品系(modern cultivated lines)的小麥，其菌根依賴度是不同的(Kapulnik and Kushnir 1991)，以小麥Triticum aestivum現代的栽培品系與原始品系比較，在1950年以前釋出的栽培品系對菌根的依賴度比在1950年以後釋出的栽培品系高(Hetrick et al. 1993, 1995)，有些小麥品系對菌根的依賴度為負值或沒有反應(Hetrick et al. 1996)。小麥陸生品系與野生品系對菌根的依賴度比高產量品系的小麥高 (Manske 1989)。Zhu等人(2001)報導指出，小麥現代栽培品系接種菌根菌後其地上部磷含量比同樣是接種菌根菌的原始品系低，顯示現代育種模式已降低小麥對菌根的依賴度。

有關水稻對叢枝菌根菌接種後的生長反應很少有研究學者報導，因為水稻生長在厭氧的水田環境下，叢枝菌根菌是否存在依然是有爭議的。在研究室的試驗中，於浸水的狀態下，叢枝菌根菌的感染率會降低，但在排水的情況下，水稻的菌根感染率很高 (Vallino 2009)。Suzuki等人 (2015) 研究64個水稻品種對叢枝菌根菌*Funneliformis mosseae*的生長反應，試驗在玻璃溫室中進行，水稻接種叢枝菌根菌生長4週後，64個品種對叢枝菌根菌的生長反應 (mycorrhizal growth response) 從−4.4%~118.9%，ARC5955品種水稻(indica rice)的菌根生長反應最高(118.9%)， Nipponbare品種水稻 (japonica rice)的菌根生長反應為18.7%。在植體營養元素含量方面，接種叢枝菌根菌可明顯ARC5955與Nipponbare兩個品種水稻地上部與根部的磷含量，且可降低地上部與根部銅與鋁的含量。叢枝菌根菌可明顯促進水稻品種ARC5955生長，但對Nipponbare品種則無明顯的促進效果。上述結果可提供水稻育種與水稻增產上新的思維與觀點。

二、叢枝菌根菌種類對作物生長效益之影響

同一種植物接種不同菌根菌種類，亦會影響其菌根依賴度。Sanders 等人 (1977) 以洋蔥接種4個不同的叢枝菌根菌，試驗結果顯示*Glomus mosseae* Gerd. & Trappe, *G. macrocarpus* var. *geospora* Gerd. & Trappe與*Gigaspora calospora* Gerd. & Trappe 這3個菌種可促進洋蔥生長，而*G. microcarpus* Tul. & Tul.對洋蔥生長無促進效果。

Pedersen 等人 (1991) 以蘆筍接種5個不同的叢枝菌根菌 (*Glomus clarum, G. intraradices, G. monosporum, G. versifome and G. vesiculiferum*)，試驗結果顯示*G. intraradices*在溫室與田間試驗中皆可顯著的增加蘆筍的乾重。接種菌根菌之組織培養苗在移栽田間14個月後，其存活率是對照組的兩倍。在另一個試驗中，蘆筍從種子開始育苗並在溫室中以泥炭土為介質，分別接種三種菌根菌(*G. fasciculatum, G. intraradices , G. vesiculiferum*)，並分別給予不同的磷肥 (0, 50, 100, 150 ppm)，在第13週及第17週進行採收。接種*G. intraradices*及*G.*

*vesiculiferum*菌根菌的植體乾重顯著高於對照組及*G. fasciculatum*接菌組。在本次試驗中發現植體乾重與菌根感染率呈正相關。菌根感染率在種植後第13週因磷肥的添加量增加而略微降低，但在第17週則不受影響。本試驗結果顯示菌根作物的增長與植體內磷濃度增加無關，因為添加磷肥並未產生生長效應，接種菌根菌作物的植體內磷濃度低於未接菌的對照組。

Sylvia等人 (1993) 評估六種不同品系的菌根菌 (*Glomus etunicatum*) 以及不同菌根菌菌種 (*G. claroides, Entrophospora columbiana*)於美國東部六個州八個合作單位共同進行比較試驗，這些菌種分別在相同的土壤與不同地區的不同土壤中接種大豆與高粱，42-57天後評估其生長效應，試驗結果顯示：菌根菌的品系在決定其生長效應的有效性上，較土壤或宿主植物來得重要。在不同州不同地點相同的土壤上發現*Glomus etunicatum* (GE329和GENPI)對大豆可產生最大的植體乾重效益；對於高粱，則除了上述兩株菌外，還有*G. etunicatum* (GE312品系) 也有相同的促進效應。在不同州不同地區土壤的試驗上，發現GE329和GENPI兩個品系對於高粱與大豆一樣可產生較佳的生長效應，其中土壤的可溶性磷濃度在10mg kg^{-1}時最佳。對大豆而言，根感染長度與菌根的生長效應無關；但高粱則呈正相關。

Graham與Abbott (2000)原認為小麥在低磷的土壤中菌根菌應可大量的感染小麥根部；在高磷的情況下應該也是如此，只是無法提供更多的磷肥吸收效益，同時造成植株矮小。Graham與Abbott兩人利用澳洲小麥生產帶所分離的10種不同菌株，在溫室中以壤砂土(loamy sand)進行小麥接種試驗。小麥分別給予低於適量與高於適量的磷肥。磷肥添加低於適量時，小麥生長受到限制。所有菌根菌分離株在小麥發芽14天後開始感染根部，第42天根部感染率在50~89%的分離株被歸類為具侵略性(aggressive)菌株，若感染率在1~19%者則被歸類為非侵略性(non-aggressive)菌株。添加高於適量的磷肥可增加幼苗的生長2-3倍，但卻減少了根的感染長度。侵略性菌株即使在高磷的條件下仍比其他菌株有較高的感染根長度。在低磷的條件下，與對照組相較，只有*Scutellospora calospora*的兩個分離株可促進小麥的生長；其他侵略性菌株與非侵略性菌株皆降低了小麥的生長。在高磷的條件下，所有侵略性菌株皆抑制了小麥的生長。在低磷的條件下，侵略性菌株可提升植體的磷濃度；然而在高磷的條件下，植體磷濃度則不受菌株的影響。侵略性菌株對小麥所產生的生長抑制現象與降低根部蔗糖濃度有關。

綜合來說，不同的菌根菌對於相同作物所展現的不同菌根依賴度，其差異主要在於不同菌根菌其根外菌絲的拓展能力不同，同時，不同的菌根菌所形成的根外菌絲對於磷的吸收能力也有差異所致 (Dickson *et al*. 1999; Smith *et al*. 2000) 。

三、土壤磷含量對叢枝菌根菌在作物生長效益之影響

植物之菌根菌依賴度受到許多土壤因子的影響，其中土壤養分，特別是可溶性磷的濃度。糧食作物樹薯 (*Manihot esculenta*)，豆科植物，柑橘類 (Graham and Eissenstat 1994)，大麥(*Hordeum vulgare*)，大豆(*Glycine max*) 等的菌根依賴度會隨著土壤中磷濃度的增加而降低。呂等人 (1995) 發現每週施用一次1/4磷量的Johnson solution (15mg/kg-P)，番茄的菌根菌感染率為73.4%，每週施用一次1/2磷量的Johnson solution (31 mg/kg-P)，番茄的菌根菌感染率下降為55.5%，每週施用一次全磷量的Johnson solution (62 mg/kg -P)，番茄的菌根菌感染率更

降為24.2%。Menge等人 (1977) 發現加州土壤中磷的含量與菌根菌的孢子數成反比。Kucey and Paul (1983) 亦報導，在不施磷肥的土壤中，蠶豆的菌根菌感染率為47%，而施用45kg-P/ha後，蠶豆的菌根菌感染率下降為15%，在施肥區土壤中，菌根菌的孢子數為30個/100g soil，在未施肥區土壤中，菌根菌的孢子數為65個/100g soil。

林與吳 (2002) 探討磷酸根離子對叢枝菌根菌孢子發芽與菌絲生長之影響，試驗菌種有六種，*Acaulospora scrobiculata, A. morrowiae, Entrophospora kentinensis, Glomus mosseae, G. occultum* 與 *G. versiforme*。試驗結果發現， *E. kentinensis, G. mosseae* 這兩種菌根菌孢子，當磷酸根離子濃度在 0.4~10 mM 時，孢子發芽率最高，分別為 73.3~90.0%，71.8~85.8%。但當磷酸根離子濃度增加至 20mM 時，這兩種菌根菌孢子之發芽率皆降至 20%以下，當磷酸根離子濃度達 40 mM 時，這兩種菌根菌孢子之發芽率皆為 0。 *A. morrowiae* 與 *A. scrobiculata* 在磷酸根離子濃度 4 mM 以下時，孢子發芽率較高，分別為 44.3~58.5 % 與 49.7~63.8 %。*G. versiforme* 在磷酸根離子濃度 2 mM 時，孢子發芽率最高為 45.5%。*G. occultum* 對磷最敏感，當磷酸根離子濃度在 1 mM 以上，則菌根菌發芽率與菌絲生長明顯下降。*E. kentinensis* 在磷酸根離子濃度 0.4~10 mM 時，菌絲長度為 0.3~0.5 mm/spore，當磷酸根離子濃度在 20 mM 以上時，孢子全數不發芽。*G. mosseae* 在磷酸根離子濃度 2 mM 時，發芽率不受影響，但菌絲生長長度開始明顯下降。*A. morrowiae* , *A. scrobiculata* 與 *G. versiforme* 這三種菌根菌孢子，當磷酸根離子濃度在 10 mM 以上時，菌絲生長明顯受抑制。

Abdullahi與Sheriff (2013) 研究叢枝菌根菌與化學肥料用量對洋蔥生長之影響，化學肥料氮肥與磷肥用量有6個等級，每公頃氮-磷用量分別為 00-00，40-20，60-30，80-40，100-50與120-60公斤，鉀肥用量固定為每公頃50公斤，叢枝菌根菌菌種為*Glomus intraradices*，試驗地土壤質地為砂質壤土，其土壤pH值為6.8。試驗結果顯示：在洋蔥苗移植田間8週後，未接種的洋蔥苗生長隨著肥料施用量增加而增加，而接種叢枝菌根菌之洋蔥苗以肥料施用量為60-30-50 kg ha^{-1} (N-P-K) 之生長最好，與未接種菌根菌但施用化學肥料120-60-50 kg ha^{-1} (N-P-K) 之對照組生長勢無明顯差異。但隨著肥料用量繼續增加，洋蔥苗的生長效益逐漸降低。

在土壤磷濃度相當高的條件下，無形成菌根的作物，其生長與形成菌根的相同作物相當，甚或超越。這種現象顯示菌根菌與宿主植物之間存在某種寄生關係的結合。在相當高磷的土壤條件下，光靠植物的根部就可獲得足夠的磷；植物不須藉由菌根的菌絲來吸收磷，但這些菌根菌卻需要自宿主植物的體內獲得碳源。為了避免產生這種寄生的結合關係，當土壤中磷濃度高時，植物本身會抑制菌根的感染率是可能的。在日本洋蔥 (*Allium cepa*) 與青蔥 (*Allium fistulosum*) 的田間土壤的有效性磷濃度很高，因此藉由菌根的形成來促進作物的生長是很難預期的 (Kato *et al*. 1985)。在日本所選育出來的青蔥品種與其他外國的品種相較，是不可能對菌根菌有高度依賴的 (Tawaraya *et al*. 2001)。

結語

在低投入的永續農業中，可藉由叢枝菌根菌持續利用土壤中的磷肥，在相同的吸收面積下，菌絲對磷的吸收量是根部的100倍 (Harley 1989)，但現代育種模式所選育出的品種或品系大多對叢枝菌根菌依賴度低，無法充分利用叢枝菌根菌的優勢，未來應在低養分與逆境下進行品種與品系的選育，才能選出與叢枝菌根菌親合性高的作物，使叢枝菌根菌在作物上的生長效益達到最大。

引用文獻

吳繼光、林素禎。 1998。囊叢枝內生菌根菌技術應用手冊。臺灣省農業試驗所出版。台灣。台中。ISBN: 957-02-1767-7。

呂斯文、張簡秀容、張喜寧。1995。利用穴植盤培育番茄菌根苗及其田間生長之反應。中國園藝 41：54-67。

林素禎、吳繼光。 2002。 磷酸根離子對叢枝菌根菌孢子發芽與菌絲生長之影響。中華農業研究。51(3):20-30。

Abdullahi, R. and H. H. Sheriff. 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and chemical fertilizer on growth and shoot nutrients content of onion under field condition in northern Sudan savanna of Nigeria. IOSR J. Agri. Veter. Sci. (IOSR-JAVS) 3(5): 85-90.

Alguacil, M. D. M., Z. Lozano, M. J. Campoy, and A. Roldán. 2010. Phosphorus fertilization management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. Soil Biol. Biochem. 42:1114–1122.

Baylis, G. T. S. 1970. Root hairs and phycomycetous mycorrhizas in phosphorus- deficient soil. Plant Soil 33:713-716.

Chan, K.Y., C. G. Dorahy, S. Tyler, A. T. Wells, P. P. Milham, and I. Barchia. 2007. Phosphorus accumulation and other changes in soil properties as a consequence of vegetable production. Aust. J. Soil Res. 45:139–146.

Colla, G., Y. Rouphael, M. Cardarelli, M. Tullio, C. M. Rivera, and E. Rea. 2008. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. Biology and Fertility of Soils 44(3):501-509.

Gerdemann, J. W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhiza. *In* The development and function of roots, eds. J. G. Torrey and D. T. Clarkson. p. 575-592. Academic Press, London.

Graham J. H. and D. M. Eissenstat. 1994. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. Plant Soil 159:179-185.

Harley, J. L. 1989. The significance of mycorrhlza. Mycol. Res. 92: 129-139.

Hetrick, B. A. D., G. W. T. Wilson, and T. C. Todd. 1996. Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. Can. J. Bot. 74: 19-251.

Hetrick, B. A. D., G. W. T. Wilson, and T. S. Cox. 1992. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties landraces and ancestors. Can. J. Bot. 70: 2032-2040.

Hetrick, B. A. D., G. W. T. Wilson, and T. S. Cox. 1993. Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors-A synthesis. Can. J. Bot. 71: 512-518.

Hetrick, B. A. D., G. W. T. Wilson, B. S. Gill, and T. S. Cox. 1995. Chromosome location of mycorrhizal responsive genes in wheat. Can. J. Bot. 73: 891-897.

Kapulnik, Y. and U. Kushnir. 1991. Growth dependency of wild, primitive and modern cultivated wheat lines on vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. Euphytica 56: 27-36.

Kato, H., N. Oka, and T. Motojima. 1985. Availability and nature of phosphorus in fields. I. Phosphorus accumulation in onion field soils. Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr. 56:279-284.

Kucey, R. M. N. and E. A. Paul. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculation with Glomus mosseae on faba bean growth in greenhouse and field trials. Can. J. Soil Sci. 63:87-95.

Manske, G. G. B. 1989. Genetical analysis of the efficiency of VA mycorrhiza with spring wheat. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 273-280.

Menge, J. A. S., N. M. Davis, and V. Minassian. 1977. Mycorrhizal fungi associated with citrus and their possible interactions with pathogens. Proc. Int. Soc. Citriculture 3:872-876.

Pedersen, C. T., G. R. Safir, S. Parent, and M. Caron. 1991. Growth of asparagus in a commercial peat mix containing veslcular-arbuscular mycorrhizal fungi and the effects of applied phosphorus. Plant Soil 135: 75-82.r

Ping, X. U., L. Z. Liang, X. Y. Dong, J. Xu, P. K. Jiang, and R. F. Shen. 2014. Response of Soil Phosphorus Required for Maximum Growth of Asparagus officinalis L. to Inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Pedosphere 24(6):776-82.

Plenchette, C., J. A. Fortm, and V. Furlan. 1983. Growth response of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. Plant Soil 70:199- 209.

Sanders, F. E., P. B. Tinker, R. L. B. Black, and S. M. Palmerley. 1977. The development of endomycorrhizal root systems. I. Spread of infection and growth-promotmg effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. New Phytol. 78: 257-268.

Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105:1413–1421.

Shukla, A., A. Kumar, A. Jha, Ajit, D. V. K. N. Rao. 2012. Phosphorus threshold for arbuscular mycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. Biology and Fertility of Soils 48(1):109-116.

Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. P. 371, Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammernarbeit (GTZ) GmbH, Germany.

Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis, Academic Press, London.

Suzuki, S., Y. Kobae, T. Sisaphaithong, R. Tomioka, C. Takenaka, and H. Shingo. 2015. Differential growth responses of rice cultivars to an arbuscular mycorrhizal fungus, *Funelliformis mosseae*. J. Horti. 2: 142.

Tawaraya, K. 2003. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. Soil Sci. Plant Nutr. 49(5): 655-668.

Tawaraya, K., K. Tokairin, and T. Wagatsuma. 2001. Dependency of *Allium fistulosum* cultivars on the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasiculatum*. Appl. Soil Ecol. 17:119-124.

Vallino, M., D. Greppi, M. Novero, P. Bonfante, and E. Lupotto. 2009. Rice root colonisation by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. Ann. Appl. Biol. 154: 195-204.

Review of arbuscularmycorrhizal fungi on the crop growth response

Su-Chen Lin[1,2] Chi-Guang Wu[3] Shiuan-Yuh Chien[4]

Abstract

In the past few decades, there were numerous publications related to the inoculation effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the plant growth; however, the report from field trials seemed not consistent. In this review, three key factors influencing mycorrhizal dependency (MD) to the crops were discussed, i.e. plant species and crop cultivars, various arbuscular mycorrhizal fungal isolates, and soil P levels. Through previous publications, the MD of most cultivated crops was lower than wild species. The MD of terrestrial lines and wild cultivars was higher than those with high yield phenotypes. The MD of latest breeding lines was lower than original parent lines. The difference in the isolates of arbuscular mycorrhizal fungi could result in different inoculation effect. The difference of crop cultivars may show different growth response to arbuscular mycorrhizal fungi as well. Most the successful inoculation effect came out of the cultivation medium or soil with low P level. The higher P level in the medium, the MD of crop decreased. In the modern breeding system, most of the breeding lines are selected from the fields with chemical fertilizers and these cultivars show low MD trait. In order to promote the use of arbuscular mycorrhizal fungi, we suggest to select new cultivars under the field background with low nutrient and environment stress.

Key words：Arbuscular mycorrhizal fungi, Crop cultivar, Crop line, Phosphorous

---

[1] Corresponding author, e-mail: linmay@tari.gov.tw

[2] Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Former Associate Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute , Taichung, Taiwan, ROC.

[4] Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute , Taichung, Taiwan, ROC.